台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.71 No.1 2022

Feature Article

1 The Impact of COVID-19 Pandemic on the Agriculture Industry and Its Adaptation
Chwen-Ming Yang, Chiao-Ling Hsiao, Chia-Hsun Ho, and Ya-Ling Hou

Research Articles

11 Development of Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction to Identify and Detect Potato Virus Y and Pepper Mottle Virus in Sweet Pepper
Cheng-Ping Kuan, Ying-Huey Cheng, Chia-Hsin Tsai, Ching-Shan Tseng, and Tso-Chi Yang

19 New Powdery Mildew of Tomato Caused by *Pseudoidium neolycopersici* and Susceptibility of Commercial Cultivars to the Disease in Taiwan
Yu-Lun Dai, Jin-Hsing Huang, Jyh-Nong Tsai, and Chu-Ping Lin

35 Characteristics of Growth and Infection of *Fusarium proliferatum* Causing Fleck Spot on Oriental Cymbidium Leaf in Taiwan
Chiao-Wen Huang, Jin-Hsing Huang, and Ting-Fang Hsieh

49 Comparison of Different Models Coupled with Temperature Changes and Farmland Variation for Modeling Growth of Iceberg Lettuce
Chu-Chung Chen, Dar-Yuan Lee, and Kai-Wei Juang

73 Identification of Ranunculus Mild Mosaic Virus on *Ranunculus asiaticus* Collected from Border Intercepted Ranunculus and the Development and Application of the Virus Detection Reagents
Chin-Chih Chen, Jia-Yi Liao, Ming-Ling Liao, Yu-Chi Liu, and Fen-Lang Chiang

ISSN 2790-086X

9 772790 086007

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

台灣農業研究 JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH Vol.71 No.1 2022

ISSN 2790-086X
DOI:10.6156/JTAR

台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.71 No.1 2022

專題論述

1 農產業遭受新冠肺炎 (COVID-19) 疫情之衝擊與調適
楊純明、蕭巧玲、何佳勳、侯雅玲

研究報告

11 以即時反轉錄-聚合酶連鎖反應技術鑑別與檢測甜椒之馬鈴薯Y病毒及番椒斑駁病毒
關政平、鄭櫻慧、蔡佳欣、曾清山、楊佐琦

19 由 *Pseudoidium neolycopersici* 引起之番茄白粉病鑑定與商業品種之感病性評估
戴裕綸、黃晉興、蔡志濃、林筑蘋

35 小花蕙蘭細斑病菌 *Fusarium proliferatum* 之生長與寄主侵染特性
黃巧雯、黃晉興、謝廷芳

49 比較不同模式耦合溫度變化與農地變異模擬結球萵苣的生長
陳柱中、李達源、莊愷瑋

73 鑑定邊境攔截之陸蓮花微嵌紋病毒 (Ranunculus mild mosaic virus) 及其檢測試劑之製備與應用
陳金枝、廖家翌、廖敏伶、劉逸琪、江芬蘭

行政院農業委員會農業試驗所出版

《台灣農業研究》編審會

總編輯

謝廷芳／農業試驗所植物病理組

領域主編 (按筆劃序)

王強生／國立中興大學農藝學系
古新梅／國立中興大學農藝學系
安寶貞／農業試驗所植物病理組
呂秀英／苗栗區農業改良場
杜宜殷／國立台灣大學園藝暨景觀學系
林彥蓉／國立台灣大學農藝學系
林慧玲／國立中興大學園藝學系
侯豐男／國立中興大學昆蟲學系
陳右人／國立台灣大學園藝暨景觀學系
陳世銘／國立台灣大學生物產業機電工程學系
陳健忠／農業試驗所應用動物組
陳琦玲／農業試驗所農業化學組
張永和／私立靜宜大學食品營養系
張瑞璋／農業藥物毒物試驗所
莊愷瑋／國立嘉義大學農藝學系
郭寶錚／國立中興大學農藝學系
黃炳文／國立中興大學應用經濟學系
黃振文／國立中興大學植物病理學系
黃裕銘／國立中興大學土壤環境科學系
黃肇家／農業試驗所作物組
楊正澤／國立中興大學昆蟲學系
楊純明／私立明道大學精緻農業學系
路光暉／國立中興大學昆蟲學系
鄒裕民／國立中興大學土壤環境科學系
劉力瑜／國立台灣大學農藝學系
蔡致榮／農業試驗所
鍾文鑫／國立中興大學植物病理學系
顏國欽／國立中興大學食品暨應用生物科技學系

英文主編 (按筆劃序)

王寅東／美國德州農工大學
張宗仁／美國喬治亞大學
楊景程／美國佛吉尼亞理工大學
鍾光仁／國立中興大學植物病理學系

邀請領域主編

陳煜焜／國立中興大學植物病理學系

編輯助理

王立蓉／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室
王紫瑜／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室

編輯顧問

陳烈夫／農業試驗所技術服務組

台灣農業研究

第七十一卷　第一期　　中華民國一一一年三月三十一日

出版者　行政院農業委員會農業試驗所
發行人　林學詩
總編輯　謝廷芳
地址　413008 台中市霧峰區萬豐里中正路 189 號
網址　http://www.tari.gov.tw/jtar
電話　(04)2331-7236
E-mail　jtar@tari.gov.tw
線上投審稿系統　https://www.ipress.tw/J0042

編印　Ainosco Press
地址　234634 新北市永和區成功路一段 80 號 18 樓
電話　(02)2926-6006
E-mail　press@airiti.com

定價　新台幣一七五元
展售門市　1. 國家書店 / 104472 台北市松江路 209 號 1 樓 / 電話 : (02)2518-0207
國家網路書店 http://www.govbooks.com.tw
2. 五南文化廣場 / 400002 台中市中山路 6 號 / 電話 : (04)2226-0330

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 71(1):1–9 (2022)
DOI:10.6156/JTAR.202203_71(1).0001

專題論述

農產業遭受新冠肺炎 (COVID-19) 疫情之衝擊與調適

楊純明[1,2,*]　蕭巧玲[3]　何佳勳[4]　侯雅玲[4]

摘要

楊純明、蕭巧玲、何佳勳、侯雅玲。2022。農產業遭受新冠肺炎 (COVID-19) 疫情之衝擊與調適。台灣農業研究 71(1):1–9。

在人類文明發展歷程中出現的傳染性疾病大流行，皆對生命、經濟、社會、環境及生活造成極大衝擊，亦形成國家社會動盪不安，2019 年年底爆發延續迄今的嚴重特殊傳染性肺炎 [coronavirus disease 2019，簡稱 COVID-19；又稱新冠肺炎病毒病 (new coronavirus 2019-nCoV)] 即為其一。COVID-19 的影響層面不僅廣泛而深遠，亦危害人體健康，截至目前為止全球已有至少 192 個國家和地區累計報告逾 1.62 億個確診個案，死亡人數超過 336.7 萬且仍在持續增加中。許多證據顯示，COVID-19 牽動農產業及糧食供應鏈的運作，主要在於改變糧食供需的狀態與模式 (生產、供應、銷售)，又因為帶來行動不便、購買力下降及對最脆弱族群的更大影響，使得糧食需求和糧食安全受到極大威脅，農民也面臨更惡劣的挑戰，而社會大眾亦多有陷入民生困境景況。隨著疫情的逐日擴大，政府除了採行更加嚴厲的因應防疫措施來遏阻病毒的傳播，並當對於糧食系統有所應對。充分善用各種智慧及數位等現代化科技和政策工具，來保護民眾健康和糧食安全，持續農場動能和農民生計，以及加速農產業在困境中升級。政府更應針對糧食供需系統及不同利益 (或利害) 關係人各方面需要採取多元的策略與措施，分從技術支援、資本 (金) 貸款、行銷輔導甚至特殊紓解方案等來對症下藥、有效緩解。民生困境中尤以維持穩定的民眾日常生活為終極目標，以維護民眾營養健康的維生系統常態運作為首要。只要能守穩經濟基本面，維護糧食供應鏈的作業機制與糧食安全，必定能在漫漫疫情中維持適當局面，當 COVID-19 病毒獲得控制時得以逐步恢復、扭轉乾坤創造新機。希望本文內容可提供有識者參考與利用，並引起各界響應而共同集思廣益，以利於全體國內農業從業人員研擬相關調適策略與措施。

關鍵詞：新冠肺炎、2019-nCoV、COVID-19、糧食安全、糧食供應鏈。

前言

在人類文明發展的歷程中多次遭遇到許多傳染性疾病的大流行，造成生命、經濟、社會、環境及生活上極大的衝擊，亦形成國家社會的高度動盪不安。以近百年曾經發生過的所謂大流行病 (pandemic) 而言，諸如西班牙流感 (Spanish flu or 1918 flu pandemic)、亞洲流感 (Asian flu or 1957–1958 influenza pandemic)、香港流感 (Hong Kong flu or 1968 flu pandemic)、伊波拉出血熱 [Ebola fever or 伊波拉病毒病 (Ebola virus disease; EVD)]、嚴重急性呼吸道症候群 (severe acute respiratory syndrome; SARS) 及2019年年底爆發延續迄今的嚴重特殊傳染性肺炎 [coronavirus disease 2019，簡稱COVID-19；又稱新冠肺炎病毒病 (new coronavirus 2019-nCoV)] 等。另外，較著稱的尚有後天免疫缺乏症候群 [acquired immune deficiency syndrome (AIDS)，或稱人類免疫缺乏病毒 human immunodeficiency virus (HIV)，通稱愛滋病]、豬流感 {swine influenza，或稱豬流感病毒 [swine in-

投稿日期：2021 年 5 月 27 日；接受日期：2021 年 9 月 13 日。
* 通訊作者：cmyang0616@gmail.com
[1] 農委會農業試驗所作物組前研究員兼組長。台灣 台中市。
[2] 明道大學精緻農業學系副教授。台灣 彰化縣。
[3] 農委會農業試驗所作物組副研究員。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所作物組助理研究員。台灣 台中市。

fluenza virus (SIV) 或swine-origin influenza virus (S-OIV)]}，這些大流行病皆因為影響層面廣且深遠而受到舉世關注 (Burnet & White 1972; Bermejo 2004; Du *et al*. 2009; Wang-Shick 2017; Farmer 2019; Siche 2020; World Health Organization 2020a, 2020b)。

西班牙流感係於 1918 年 1 月至 1920 年 12 月間爆發的致命大流行病，屬於 H1N1 病毒的新型流感，當時世界 5 億人口約 1/4 感染，造成全球約 2,000–5,000 萬人死亡，在當時乃人類歷史上致死人數僅次於黑死病的疫情 (Borza 2001; Gagnon *et al*. 2013; World Health Organization 2013; Rosenwald 2020; Spreeuwenberg *et al*. 2020)。

至於目前已經延續超過一年半，令人擔憂的嚴重特殊傳染性肺炎/新冠肺炎 (COVID-19)，則係由嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒 2 型 (SARS-CoV-2) 引發的傳染性疾病。確診案例最早於 2019 年 12 月在中國大陸湖北省武漢市發現，目前已擴散至全球各國大規模爆發，成為歷史上致死人數最多的大流行疾病之一 (Islam 2020; Saniasiaya *et al*. 2020a, 2020b; Wang *et al*. 2020; World Health Organization 2020c; Centers for Disease Control and Prevention 2021; Oran & Topol 2021; Page *et al*. 2021; Zimmer 2021)。截至 2021 年 5 月 14 日，全球已有 192 個國家和地區累計報告逾 1.62 億個確診個案，死亡人數超過 336.7 萬且仍在持續增加中，全球病死率約為 2.9% (Worldometer 2021)。

然而，無論何種大流行疾病的蔓延，均對於人類的各種活動及經濟/產業運轉帶來無可避免的重大危害，吾人必須審慎面對、處置及採行各種可行的因應調適，以期降低疫情中的生命財產損失和環境生態危機，並謀求疫情後的早日恢復大地生機。許多證據顯示，正嚴重發生中的COVID-19已對於農產業 (含農、林、漁、畜) 及糧食供應鏈 (food supply chain) 造成深遠影響，其主要在於改變糧食供需的狀態與模式 (即產銷供應鏈)，進而影響糧食安全 (food security)，尤其以最弱勢群體受到的衝擊最大，台灣亦無法倖免。本文據此整理、分析及歸納各方資訊，提供識者參考與利用，並期引起各界發響共同集思廣益攜手努力，以有助於全體國內農業從業人員研擬相關調適策略與措施。

COVID-19 對農產業的衝擊

自從新冠肺炎 COVID-19 最初案例於 2019 年 12 月 31 日在中國大陸武漢市出現以來 (Wang *et al*. 2020; World Health Organization 2020c)，已迅速的擴散至幾乎世界各地形成大規模的感染情形，時至今日已成為全球性的健康災難，並嚴重干擾社會各面向的正常發展和人類的各種活動。可以想見常態的農產業衝擊必將對經濟成長造成影響。而隨著疫情的大爆發更可能因為糧食生產鏈受到各方面影響，導致產銷失衡 (Food and Agriculture Organization 2020b)，無法維持民眾的常態需求，進而可能衍生營養缺乏甚至在某些國家地區造成饑餓人口問題。乃至於務農人力支援短缺影響農業經營、農產品輸運及資源 (材) 配置等，進一步造成世界性的糧食安全危機 (Lopez-Ridaura *et al*. 2019; Abdelhedi & Zouari 2020)。例如，一項世界衛生組織 (World Health Organization; WHO) 於 2020 年 3 月做的統計顯示，糧食價格指標隨著 COVID-19 發生與死亡案例的增加而升高 (World Health Organization 2020a)。因此，為緩解 COVID-19 對農產業的衝擊及糧食安全的影響，吾人必須探討其中關鍵因素並釐清疫情的影響，才能謀求如何解決糾結的方法與路徑。

整體來說，COVID-19 大流行及其引發的相關經濟波動，對農業生產、糧食供應和農村生活都有影響，延伸至更大的糧食安全問題。美國農部經濟研究署 (Economic Research Service; ERS) 針對 COVID-19 疫情的一項研究計畫顯示，從農場至消費者的系列生產供應鏈皆可能受到疫情影響，包括農場業者、加工者、處理者、零售店/市場和貿易商/物流業者等利害關係人，甚至於亦對消費者、食品援助計畫參與者、農村居民和農民造成經濟衝擊 (Economic Research Service, United States Department of Agriculture 2021)，產生經濟安全的風險。因此 ERS 相關研究涵蓋多面向的主題

(Food and Nutrition Service, United States Department of Agriculture 2021a, 2021b)，關注的關鍵主題在於探討疫情下的農場與農戶遭遇的困難，農產品與消費者之間關係，以及農村的景況，尤以大宗肉類包裝行業的處境為主要對象，而其強調的重點以美國本地面對的問題為焦點。因此，政府有關單位應當審慎評估在地社會經濟受到 COVID-19 的衝擊，諸如生產與貯運的配合、資源 (材) 與人力的調配、市場與行銷的通暢等，只要能夠適時解決糧食與商品產業的瓶頸，並提前規劃與部署預料情境，即可正常維持農業產銷鏈及維護糧食安全。

2002–2004 年發生的 SARS 疫情透過模型分析結果，雖然對於台灣農業之影響屬輕微 (Huang 2003)，但是就農產品價格、農產品產量、農產品產值及農業生產毛額 (gross domestic product; GDP)、農業勞動力，以及對漁業部門影響等方面，仍均產生不等程度與範圍的負面效應。因此，當時農政部門已預擬因應對策及建立危機處理標準作業程序，以防範謠言、恐慌、大規模隔離及供應鏈中斷等帶來之短暫性衝擊。時至今日，千百倍於 SARS 的 COVID-19 疫情，已對台灣社會和各產業帶來極大危機，更需要政府聯合各方利害關係人 (從農民、農場業者、加工者、處理者直至零售店/市場和貿易商/物流業者) 瞭解和釐清問題與風險，才能同步致力於防疫、紓困及振興措施 3 方面的併行因應，包括直接影響糧食供應與糧食安全的農產業。

事實上糧食的產銷失衡屬於「供」、「需」的雙向失調，在疫情下需求將失之偏頗或恐慌性的增加，更因為通過性的限制 (passability restrictions) 而降低糧食可及性 (accessibility) (Food and Agriculture Organization 2020b)。換言之，雖然可獲取性 (availability) 與消費量 (consumption) 大致持平，但是農產的輸運與品質可能無法正常作業而出現減少或不足的現象，使得糧食未能維持正常的供給與需要。從生產者、資材投入、農機操作、初級農產原料、貯運、加工 (次級農產品)、包裝至行銷等系列農業產銷系統，直到市場與消費者等需求端，任一糧食供應鏈環節皆可能受到疫情影響，產生了糧食安全的風險 (Chen *et al*. 2020)。尤其當疫情期間延長時，無論產或銷，都可能逐一浮現各種難以預料的狀況。特別是疫情帶來的暫時性失業或行動不變，將可能降低民眾購物意願與對農產品的消費能量，回饋造成供應鏈各環節的失衡。

農產業的因應調適

糧食供應

如前述，「糧食供應鏈」為從農場生產至消費者餐桌的一連串流程形成的產銷鏈結，COVID-19 疫情起初將帶來所謂社交孤立 (social isolation)，惶恐的消費者將直接至供應中心購物，使得部分產品因為搶購出現短缺情形，即使糧食生產線此時仍維持常態運轉。疫情下人員流動的限制引起短暫勞動力缺乏及運輸量下降，基本上未必形成當地必需品的供應缺口，但是貨物的進出口則因入出境管制而中斷，使得進口與出口產品停滯影響國際貿易。惟只要疫情管控得宜不再擴散，短期的不穩定之後，往來貿易即可隨後穩定進行。在疫情期間若為了穩定民心，可以臨時性的增加在地生產量、維持市場的足夠供應量，即可對於上漲的物價有以量制價的效果。對於農產業資源欠缺而人口眾多的國家地區 (如中國大陸)，則可能因為未有完善的糧食供應系統及調適措施而受挫，甚至骨牌般的產生其他更多的困難 (Zhang 2020)；例如中國大陸發生因為飼料供給不足及勞動力短缺帶給畜禽產業極大衝擊。疫情固然使得部分國家的糧食供給與價格上漲，較高價的肉製品及易腐產品售價偏高，就整個國際糧價而言，基本生活必需品價格預計仍不至於飆升。但是當疫情未獲得控制不斷的升高，或未有適當的調適準備時，混亂情形將不可預料，政府應當有所準備及超前部署才是。

糧食需求

除了必需品之外，疫情的發生將使得消費者降低購物的意願與消費能量 (Gottheil 2013)，人們不願意冒著傳染病的未知風險外出，再者可能由於失業或減少工作收入而失去購物動機 (Food and Agriculture Organization 2020a) 致使消費能量下降。但是，如前述短

時間內仍可能因為民眾搶購造成當地糧食短少，或因此引起食品價格上漲，這些都是政府需要注意和防範的負面現象。另一方面，在網路發達、數位化科技進步的國家地區，由於檢疫政策與防疫規定，糧食、飲料和日用品的線上消費產業及消費數目與日俱增 (Food and Agriculture Organization 2020b)，以避免人與人近距離傳染的機會。有些先進國家地區和高端產業甚至以無人載具 (機) (drone) 來傳送貨品，或以農業機器人來操作指令，隔絕人員之間的接觸 (Siche 2020)。這些購物行為當然會改變糧食輸運與配送的模式，引起各行各業之間的消長、變化，重要的是維持糧食的供應以免非理性的恐慌導致糧安惡果。台灣目前在工業生產上已廣泛使用機器人，但是農產業的生產流程則相對落後。未來隨著公私部門的投資和科技的進展，無人載具和農用機器人的使用必然更為普遍，將有助於維持糧食供應的穩定性。

糧食安全

「糧食安全」係指能夠可靠的獲得足夠數量且可負擔得起營養食品的狀態，在 2009 年由聯合國發起的「糧食安全世界高峰會」(World Summit on Food Security) 上宣告的「世界糧食安全領袖會議宣言」(Declaration of the World Summit on Food Security)，進一步明確定義糧食安全的 4 大內涵/要件為：可獲取性 (availability)、可及性 (accessability)、利用率 (utilization) 和穩定性 (stability) (World Summit on Food Security 2009)，世界各國的主政者應當全力確保其國人都能夠不受限制的取得生活上所需要的糧食。然而在嚴峻疫情下，確保糧食安全成了不易達到的議題，尤其處於長期飢餓者、低收入家庭營養不良兒童及單純小農等弱勢族群，更需要給予較多的關懷和協助 (Action Against Hunger 2020)。例如單純小農以務農為生，如因為疫情無法工作或出售農產品、購買營農資材，將影響其生計。相關政策當著力於維護糧食供應鏈的積極運作，並減輕疫情對整個糧食系統的衝擊，且透過完善的社會計畫給予救助或救濟來儘量減少短期危機。亦當特別注意弱勢族群的疫情防護，以免病毒傳播給他們成為防疫上的破口，並在疫情期間給予妥善醫療照護。

農場營運的韌性/恢復力 (resilience)

COVID-19 大流行在世界各地皆造成破壞性的多樣且深遠影響，在不確定因素之下，許多的食品、商品、勞動力、能源等市場或停滯不前或部分停工，使得總體產業經濟放緩腳步。農產品短期間內的需求亦參差不齊，有些民生日用品因為民眾搶購而供貨不及，有些加工產品卻滯銷怠貨而使得農產原料無法順利售出，長期下來形成產銷失衡甚至於原料下跌而物價上漲。總此情況，必將引起公眾的廣泛關注和社會的不安，並引發了人們對食品供應和負擔能力的憂慮。值得特別重視的是農場的營運及農民生計受到的衝擊，例如資材 (如種苗、肥料、農藥等) 的購買與運送、耕種與代耕人力的短缺、田間成熟作物的採收與販售、農產的物流與上架等。部分農場可能因為營運停滯、營收短收而解僱員工、休業，致使農村失業率上升，或必須增加農場借貸以彌補財務缺口，皆將製造社會與財政額外難題，並影響農民生計。

其實，美國農業亦遭遇類似景況，其農場營運和農民生計更是長時間忍受多重困境 (Johansson 2020)。在國際農產品的貿易上，自從 2012 年起全球的大宗農產品生產量已普遍超過消費需求，使得美國和世界糧價持續跌落。例如，美國玉米與大豆的生產者價格分別下降 48% 及 40%，過去 5 年來牛、豬、肉雞和牛奶等畜產品的價格也呈下降趨勢，然而這些商品在 2019 年的生產成本卻高於或僅略低於 5 年前的數字 (Economic Research Service, United States Department of Agriculture 2021)。以美國為鏡，農政單位當密切追蹤內、外銷農產品價格的起伏，一方面調節在地消費產品的生產以平穩國內物價，另方面更應積極收集國際貿易資訊、匯率波動及關稅增減以擬定促進農產外銷措施，如此以刺激農場動能和確保農民收入。另在 COVID-19 疫情的陰影籠罩下，世界各國普遍採行量化寬鬆貨幣 (quantitative easing; QE) 政策救經濟，引起通貨膨脹隱憂。在此情況政府增加在農業上的投資也是必要項

目，包括農業資材 (含種苗、肥料、農藥)、農業機械、農業設施、冷鏈物流、水力灌溉等硬體設備 (施)，以及內外銷產銷管道、線上交易平台、防災救災網絡、農民保險、科技研發等軟體在內，總以強化糧食供應鏈與糧食安全的基礎建設。在從農勞務人力短缺、產品偵 (檢) 測及食品安全部分，農政部門可以因勢利導加強農機和智慧農業科技的推廣使用，善用諸如資通訊、遙測、網路運算、大數據及數位化與自動化作業系統，提高農產業和個別農場操作的效率與效能。

除此之外，政府和農民皆需要注意天氣與氣候相關的挑戰 (如乾旱、淹水、酷熱、低溫、颱風等)，這些可能增加生產成本的問題將會擠壓許多農作物、畜產或漁穫的利潤，甚至於嚴重災損。如何在 COVID-19 疫情加上氣候變遷情境造成更加頻繁的逆境及天然災害下維持生產的韌性，儘快的恢復原來的生產力，乃各方應當重視與努力的課題。氣候變遷的地表氣溫上升、降水型態改變、極端天氣強度與頻率增加及海平面上升等 4 大物理性徵狀 (Core Writing Team *et al*. 2007)，無一不會引起前述的逆境或天然災害和產業的損失。台灣自 2020 年迄今的連續乾旱現象，除了人為的水利建設未能追上現況及台灣全島的熱島效應 (urban heat island; UHI) 因素之外，氣候變遷引起的全球天氣系統異常、台灣上空高氣壓系統盤據、以及缺少春雨、梅雨、颱風雨量等也是主要原因。乾旱缺水造成各行各業的災情有目共睹，當加上 COVID-19 疫情及疫情衍生糧食供應鏈失衡問題，更將呈現倍增破壞力，不可不慎及妥適因應。再者，天氣與氣候的季節性改變，或因氣候變遷造成的異常與極端化，對於疫情本身、民眾群聚行為及農產業從業人員農事操作等的影響，亦值得有關部門探討和因應。

農民面臨的挑戰及調適

COVID-19 疫情對農民及其家人的影響結果是直接而嚴重的，一般在短期間內農民需要克服的是資材/能源購買與農耕人力短缺，中期是販 (銷) 售與物流問題，長期則是生產成本增加與生產力衰退。這些攸關農民生計與權益的項目，除了是農民需要自身去面對的挑戰，也非常需要農政單位和社會大眾的關切與維護，建立對應的系統與機制去解決與因應調適。政府針對農、林、漁、畜各個產業應當儘速盤點其特定問題，邀集相關專家學者一起討論與研擬對策，協同農民、農會、農民團體和私部門共同參與，謀求因應解決方案。

其次，台灣近 2 年發生的乾旱缺水，進一步突顯灌溉水權與水價、灌溉系統老化與覆蓋比例偏低，以及水利建設與雨水保全 (留) 等以往被忽視的議題。種種乾旱缺水爆發出的狀況，讓大家意識到台灣淺碟型農業的弱點，農業資源與人力的不足，適用農業現代化科技使用的落後，以及用水效率 (water use efficiency) 與水分生產力 (water productivity) 的提升等農業發展上有待加強的功課。此外，農民的心理建設、農情資訊的推播及現代化農耕科技的擴大應用亦是重要工作，讓農民獲得透明公開的正確信息可以避免以訛傳訛，教 (宣) 導農民相關法規政策可以提高依法守法的觀念，利用現代化農耕科技可以提高農場及農地的性價比 (cost performance ratio; CP 值)，更重要的是如何讓農民在疫情期間及氣候變遷情境下能夠依然保持農耕的動能及恢復的韌性。如此，才能將危機轉化成泰然自處，在不確定性下順勢發展，並且利用此機會促進農業升級，從而奠定韌性農業的礎石。

結語

由於疫情在短期間內已迅速散播至世界各地，造成大規模的人數感染與患者死亡，又快速產生變種病毒，COVID-19 已成為本世紀最嚴重的大流行傳染疾病。尤有甚者，COVID-19 疾病亦對人類的行動和社經活動造成很大的影響，雖然有些許產業蒙受其惠，惟包括農業在內的多數產業均無法倖免重大衝擊。由於帶來行動不便、購買力下降及對最脆弱族群的更大影響，使得糧食需求和糧食安全受到極大威脅 (Siche 2020)，農民也面臨更惡

劣的挑戰 (Economic Research Service, United States Department of Agriculture 2021)。隨著疫情的逐日擴大，政府除了採行更加嚴厲的因應措施來遏阻病毒的傳播，增進民眾自身免疫力，同時也當對於糧食系統有所應對。充分善用各種智慧、數位及自動等現代化科技和政策工具，來保護民眾健康和糧食安全，持續農場動能和農民生計，加速農產業在困境中升級。更應針對糧食供需系統及不同利益關係人的各方面需要採取廣泛的策略與措施，分從技術支援、資本 (金) 貸款、行銷輔導甚至特殊紓解方案等來對症下藥、有效緩解系統的破口。

此外，在長期疫情衝擊下，社會大眾亦多有陷入生活困阨者，政府有關部門應予重視協助緩解，在施政上做大幅調整。而在民生困境中尤以維持穩定的民眾日常生活為終極目標，以維護民眾營養健康的維生系統常態運作為首要。其中重要的是農業生產系統的網絡建構、系統分析等，由於這些都要人為操作，因此系統中每個環節在人工智慧 (artificial intelligence; AI) 高度普遍化之前，由生產、運銷、各級市場直至餐桌，最基礎的人力資源 (從農民、農事研究班、農業產銷班、四健會、家政改進班、農會農事小組，直至農企業的農場、產銷公司等)，概需要予以培訓與精進。本文同時強調防疫措施、紓困措施及振興措施等三方面兼顧併行的重要性，對於從農民、農場至整體農產業系統提供系統性、整合性的解決方案，既可紓困又有振興效果。對於穩定民眾糧食需求和社會秩序最重要的農產業，政府必須要有深謀遠慮的思維和主張，提前、提早部署和擬定因應措施，避免引起民眾生活的不便或甚至造成恐慌。固然有些緊急措施暫時影響某些產業運轉，或帶來民眾生活上的不便利，只要能守穩經濟基本面，維護產銷鏈的作業機制與糧食安全，避免斷鏈危機，必定能在漫漫疫情中維持適當局面，當 COVID-19 病毒獲得控制時得以逐步恢復、扭轉乾坤創造新機。

引用文獻

Abdelhedi, I. T. and S. Z. Zouari. 2020. Agriculture and food security in North Africa: A theoretical and empirical approach. J. Knowl. Econ. 11:193–210. doi:10.1007/s13132-018-0528-y

Action Against Hunger. 2020. Coronavirus: How action against hunger is responding to the pandemic. https://www.actionagainsthunger.org/story/coronavirus-how-action-against-hunger-responding-pandemic (visit on 05/17/2021)

Bermejo, A. 2004. HIV/AIDS in Africa: International responses to the pandemic. New Econ. 11:164–169.

Borza, T. 2001. Spanish flu in Norway 1918–19. Ny Raekke. 121:3551–3554.

Burnet, M. and D. O. White. 1972. Natural History of Infectious Disease. 4th ed. Cambridge University Press. Cambridge, UK. 288 pp.

Centers for Disease Control and Prevention. 2021. Interim clinical guidance for management of patients with confirmed coronavirus disease (COVID-19). Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia. https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/clinical-guidance-management-patients.html (visit on 05/14/2021)

Chen, S., S. Brahma, J. Mackay, C. Cao, and B. Aliakbarian. 2020. The role of smart packaging system in food supply chain. J. Food Sci. 85:517–525. doi:10.1111/1750-3841.15046

Core Writing Team, R. K. Pachauri, and A. Reisinger. 2007. Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Intergovernmental Panel on Climate Change. Geneva, Switzerland. 104 pp.

Du, N., X. X. Yang, L. Yang, Y. H. Zeng, S. M. Zou, H. Bo, Y. L. Guo, D. X. Li, and Y. L. Shu. 2009. Review on the etiological property of 1957 Asian flu virus (H2N2). Chinese J. Virol. 25:12–16. (in Chinese)

Economic Research Service, United States Department of Agriculture. 2021. COVID-19 economic implications for agriculture, food, and rural America. Economic Research Service, United States Department of Agriculture, Washington, DC. https://www.ers.usda.gov/covid-19/ (visit on 05/18/2021)

Farmer, P. 2019. Ebola, the Spanish flu, and the memory of disease. Crit. Inquiry. 46:56–70. doi:10.1086/705301

Food and Agriculture Organization. 2020a. FAO Director-General urges G20 to ensure that food value chains are not disrupted during COVID-19 pandemic. Food and Agriculture Organization. Rome, Italy. http://www.fao.org/news/story/en/item/1268254/icode/ (visit on 05/16/2021)

Food and Agriculture Organization. 2020b. Novel coronavirus (COVID-19). Q&A: COVID-19 pandemic:

Impact on food and agriculture. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy. http://www.fao.org/2019-ncov/q-and-a/impact-on-food-and-agriculture/en/ (visit on 05/15/2021)

Food and Nutrition Service, United States Department of Agriculture. 2021a. State guidance on coronavirus P-EBT. Food and Nutrition Service, United States Department of Agriculture, Alexandria, VA. https://www.fns.usda.gov/snap/state-guidance-coronavirus-pandemic-ebt-pebt (visit on 05/18/2021)

Food and Nutrition Service, United States Department of Agriculture. 2021b. Supplemental Nutrition Assistance Program (SNAP). Food and Nutrition Service, United States Department of Agriculture, Alexandria, VA. https://www.fns.usda.gov/snap/supplemental-nutrition-assistance-program (visit on 05/18/2021)

Gagnon, A., M. S. Miller, S. A. Hallman, R. Bourbeau, D. A. Herring, D. J. Earn, and J. Madrenas. 2013. Age-specific mortality during the 1918 influenza pandemic: Unravelling the mystery of high young adult mortality. PLoS ONE 8(8):e69586. doi:10.1371/journal.pone.0069586

Gottheil, F. M. 2013. Principles of Microeconomics. 7th ed. Cengage Learning. Boston, MA. 592 pp.

Huang, C. T. 2003. An assessment of the economic impact of SARS on agricultural sector. Agric. Policy Rev. 133. https://www.coa.gov.tw/ws.php?id=3930 (visit on 07/20/2021) (in Chinese)

Islam, M. A. 2020. Prevalence of headache in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis of 14,275 patients. Front. Neurol. 11:562634. doi:10.3389/fneur.2020.562634.

Johansson, R. 2020. America's farmers: Resilient throughout the COVID pandemic. United States Department of Agriculture, Alexandria, VA. https://www.usda.gov/media/blog/2020/09/24/americas-farmers-resilient-throughout-covid-pandemic (visit on 05/06/2021)

Lopez-Ridaura, S., L. Barba-Escoto, C. Reyna, J. Hellin, B. Gerard, and M. van Wijk. 2019. Food security and agriculture in the Western Highlands of Guatemala. Food Secur. 11:817–833. doi:10.1007_s12571-019-00940-z

Oran, D. P. and E. J. Topol. 2021. The proportion of SARS-CoV-2 infections that are asymptomatic: A systematic review. Ann. Intern. Med. 174:655–662. doi:10.7326/M20-6976

Page, J., D. Hinshaw, and B. McKay. 2021. In hunt for COVID-19 origin, patient zero points to second Wuhan market: The man with the first confirmed infection of the new coronavirus told the WHO team that his parents had shopped there. The Wall Street Journal. https://www.wsj.com/articles/in-hunt-for-covid-19-origin-patient-zero-points-to-second-wuhan-market-11614335404 (visit on 05/14/2021)

Rosenwald, M. S. 2020. History's deadliest pandemics, from ancient Rome to modern America. April 7, 2020, The Washington Post. https://www.washingtonpost.com/graphics/2020/local/retropolis/coronavirus-deadliest-pandemics/ (visit on 05/06/2021)

Saniasiaya, J., M. A. Islam, and B. Abdullah. 2020a. Prevalence and characteristics of taste disorders in cases of COVID-19: A meta-analysis of 29,349 patients. Otolaryngology Head Neck Surg. 165:33–42. doi:10.1177/0194599820981018

Saniasiaya, J., M. A. Islam, and B. Abdullah. 2020b. Prevalence of olfactory dysfunction in coronavirus disease 2019 (COVID-19): A meta-analysis of 27,492 patients. Laryngoscope 131:865–878. doi:10.1002/lary.29286

Siche, R. 2020. What is the impact of COVID-19 disease on agriculture? Sci. Agropecu. 11:3–6. doi:10.17268/sci.agropecu.2020.01.00

Spreeuwenberg, P., M. Kroneman, and J. Paget. 2020. Reassessing the global mortality burden of the 1918 influenza pandemic. Amer. J. Epidemiol. 187:2561–2567. doi:10.1093/aje/kwy191

Wang, H., Z. B. Wang, Y. Dong, R. Chang, C. Xu, X. Yu, S. Zhang, L. Tsamlag, M. Shang, J. Huang, Y. Wang, G. Xu, T. Shen, X. Zhang, and Y. Cai. 2020. Phase-adjusted estimation of the number of coronavirus disease 2019 cases in Wuhan, China. Cell Discov. 6:10. doi:10.1016/s0140-6736(20)30154-9

Wang-Shick, R. 2017. Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses. 1st ed. Elsevier Inc./Academic Press, New York, NY. 440 pp.

World Health Organization. 2013. Pandemic lnfluenza Risk Management WHO Interim Guidance. World Health Organization. Geneva, Switzerland. 62 pp.

World Health Organization. 2020a. Coronavirus disease (COVID-2019). Situation reports. World Health Organization, Geneva, Switzerland. https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports (visit on 05/15/2021)

World Health Organization. 2020b. HIV/AIDS: Global situation and trends. Global Health Observatory (GHO) data. World Health Organization, Geneva, Switzerland. https://www.who.int/gho/hiv/en (visit on 05/15/2021)

World Health Organization. 2020c. Novel corona-virus (2019-nCoV): Situation report, 1. World Health Organization, Geneva, Switzerland. https://apps.who.int/iris/handle/10665/330760 (visit on 05/05/2021)

World Summit on Food Security. 2009. Declaration of the world summit on food security. http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/Summit/Docs/Final_Declaration/WSFS09_Declaration.pdf (visit on 05/16/2021)

Worldometer. 2021. COVID-19 coronavirus pandemic. Coronavirus cases and deaths. https://www.worldometers.info/coronavirus/ (visit on 05/14/2021)

Zhang, X. 2020. Chinese livestock farms struggle under COVID-19 restrictions. https://www.ifpri.org/blog/chinese-livestock-farms-struggle-under-covid-19-restrictions (visit on 05/16/2021)

Zimmer, C. 2021. The secret life of a Coronavirus. The New York Times. https://www.nytimes.com/2021/02/26/opinion/sunday/coronavirus-alive-dead.html (visit on 05/14/2021)

The Impact of COVID-19 Pandemic on the Agriculture Industry and Its Adaptation

Chwen-Ming Yang[1,2,*], Chiao-Ling Hsiao[3], Chia-Hsun Ho[4], and Ya-Ling Hou[4]

Abstract

Yang, C. M., C. L. Hsiao, C. H. Ho, and Y. L. Hou. 2022. The impact of COVID-19 pandemic on the agriculture industry and its adaptation. J. Taiwan Agric. Res. 71(1):1–9.

The pandemics of infectious diseases that have emerged in the course of the development of human civilization have caused great impacts on life, economy, environment, and livelihood, and have also created social turmoil in the world. The outbreak of the coronavirus disease 2019 (COVID-19, also known as new coronavirus 2019-nCoV) that we are experiencing is one of them. The impact of COVID-19 is not only wide-ranging and far-reaching but also harmful to human health. So far, at least 192 countries and regions around the world have reported more than 162 million confirmed cases, and the death toll exceeds 3.367 million and is still increasing. Many pieces of evidence show that COVID-19 affects the processes of agriculture and the food supply chain, mainly due to changing the state and pattern of food supply and demand and the inconvenience of transportation, the decline in purchasing power, and the greater impact on the most vulnerable groups. Food demand and food security are greatly threatened, and farmers are facing even worse challenges. As the pandemic expands daily, many governments have adopted more stringent response measures to curb the spread of the virus, and should also respond to the food system as well. Many measurements must be implemented to protect people's health and food security, sustain farm operation momentum and farmers' livelihoods, and accelerate the upgrading of the agriculture industry. Those include: making full use of modern technology and policy tools, such as smart agriculture and digital technology (e.g., Information and Communication Technology, Internet of Things, Big Data, Cloud Computing and Automatic Systems), interest rate adjustment and change tariffs and subsidies. Our government should also adopt diversified strategies and measures in response to the needs of the food supply and demand system and the needs of different stakeholders, ranging from technical support, capital (fund) loans, marketing counseling to special relief programs. As long as the economic fundamentals are maintained and the operation mechanism of the production and marketing chain and food security are functioning, it will surely be able to sustain a stable situation in the long pandemic. When the COVID-19 virus is brought under control, all situations will gradually return to a normal state and new opportunities will emerge for economic, social, and personal development. Hopefully, this article can be used for reference, which might trigger the collective brainstorming from all dimensions in order to help all domestic agricultural practitioners to develop relevant adaptation strategies and measures.

Key words: Coronavirus disease 2019, 2019-nCoV, COVID-19, Food security, Food supply chain.

Received: May 27, 2021; Accepted: September 13, 2021.

[*] Corresponding author, e-mail: cmyang0616@gmail.com

[1] Former Research Fellow and Division Director, Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

[2] Associate Professor, Department of Post Modern Agriculture, MingDao University, Changhua County, Taiwan, ROC.

[3] Associate Research Fellow, Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

[4] Assistant Research Fellows, Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 71(1):11–18 (2022)
DOI:10.6156/JTAR.202203_71(1).0002

研究報告

以即時反轉錄-聚合酶連鎖反應技術鑑別與檢測甜椒之馬鈴薯 Y 病毒及番椒斑駁病毒

關政平 [1,*]　鄭櫻慧 [2]　蔡佳欣 [3]　曾清山 [1]　楊佐琦 [4]

摘要

關政平、鄭櫻慧、蔡佳欣、曾清山、楊佐琦。2022。以即時反轉錄-聚合酶連鎖反應技術鑑別與檢測甜椒之馬鈴薯 Y 病毒及番椒斑駁病毒。台灣農業研究 71(1):11–18。

本研究利用 real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 核酸增幅技術，首次建立可鑑定和區分馬鈴薯 Y 病毒 (potato virus Y) 及番椒斑駁病毒 (pepper mottle virus) 之方法。結果顯示本核酸增幅技術，可同時偵測甜椒罹染馬鈴薯 Y 病毒及番椒斑駁病毒，與其他茄科病毒及健康之植物無反應，對於單一或是複合感染皆可鑑定，由結果顯示此核酸增幅技術具有專一性佳及靈敏度高等優點，且可用於定量病毒在罹病組織內之濃度，將可應用於田間番椒罹染此 2 種病毒之監測。

關鍵詞：馬鈴薯 Y 病毒、番椒斑駁病毒、偵測、Real-time RT-PCR 增幅技術。

前言

馬鈴薯 Y 屬病毒 (*Potyvirus*) 為 Potyviridae 科之絲狀病毒基因體，長度約 737 nm × 11 nm 之單股 RNA 基因體，分子量大小約 10 kb (Shukla *et al*. 1994)。*Potyvirus* 感染茄科作物，造成世界性病害，包括馬鈴薯 (*Solanum tuberosum* L.)、甜椒 (*Capsicum* spp.) 和番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 等作物之損失 (Benner *et al*. 1985)。此屬病毒與馬鈴薯病毒有血清學上之關係 (Purcifull *et al*. 1975)。在台灣，田間感染番椒作物的病毒則有馬鈴薯 Y 病毒 (potato virus Y; PVY) (Lee 1970)、番椒葉脈斑駁病毒 (pepper veinal mottle virus) (Cheng *et al*. 2009)、辣椒葉脈斑駁病毒 (chilli veinal mottle virus) 和番椒斑駁病毒 (pepper mottle virus; PepMoV) (Cheng *et al*. 2011, 2013) 等。許多番椒病毒病癥不易區分，在感染初期植株葉片產生小型黃斑，病斑逐漸擴大形成綠色嵌紋病徵，影響果實產量與品質。在田間，甜椒被 2 種或是 2 種以上病毒的感染相當常見，多重病毒感染率甚至可到 90% (Abdalla *et al*. 1991)。

PepMoV 和 PVY 由蚜蟲以非持久方式傳播而感染茄科作物 (Han *et al*. 2006)；田間常見 PepMoV 感染甜椒造成重大損失 (Kim *et al*. 2009)。而 PVY 被認為是影響全世界經濟最重要的病毒之一 (Scholthof *et al*. 2011; Quenouille *et al*. 2013)，除感染馬鈴薯引起損失外，且威脅番茄和番椒等作物生產 (Scholthof *et al*. 2011; Crosslin 2012; Quenouille *et al*. 2013)。

目前植物病毒常見之檢測方法包括酵素連結抗體免疫標誌法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) (Dietzgen & Thomas 1991; Kubota *et al*. 2011)、反轉錄聚合酶連鎖反應法 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR) (Gyoutoku *et al*. 2009) 等，

投稿日期：2021 年 4 月 14 日；接受日期：2021 年 10 月 12 日。
[*] 通訊作者：pcr123@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組副研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所生物技術組研究員兼組長。台灣 台中市。

另外即時反轉錄聚合酶連鎖反應 (real-time RT-PCR) 方法也廣泛用在多種植物病毒檢測 (Mackay 2004)，惟目前尚缺利用 real-time RT-PCR 於甜椒檢測 PVY 及 PepMoV 之方法。本研究主要是利用 real-time RT-PCR 反應，以 PVY 和 PepMoV Nib 基因區域結合的專一性探針，檢測樣品是否帶有 *Potyvirus* 屬病毒，探討此核酸檢測法之檢測專一性與靈敏度，並達到可區分 PepMoV 和 PVY 的鑑別檢測效果，以建立 real-time RT-PCR 對此 2 種病毒之檢測應用效益。

材料與方法

病毒來源

採集自南投縣之彩色甜椒，葉片呈現嵌紋及植株矮化病徵等疑似病毒感染 (如 PVY 或 PepMoV) 者為試驗材料。取其葉片以 10 倍量 (w/v) 磷酸鉀緩衝液 (0.01 M $KHPO_4$, pH 7.0) 研磨後，經汁液接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 進行單斑分離 3 次。取單一分離株接種於煙草 (*Nicotiana benthamiana*) 植物，作為本試驗接種源並將病葉組織置於 50% 甘油於 -20℃長期保存。

取罹病 *N. benthamiana* 作為接種源依前述方法接種甜椒 (*Capsicum annuum*)，甜椒種植約一個月大，分別接種包括 PVY 和 PepMoV，並種植於溫室進行病徵觀察觀察 6 wk 後採集葉片，經 RT-PCR 及核酸定序方法做確認。其他病毒分離株包括：potato virus X (PVX)、tobacco mosaic virus (TMV)、tomato mosaic virus (ToMV)、cucumber mosaic virus (CMV) 和 pepper mild mottle virus (PMMoV) 等，為本所植物病理組病毒與細菌研究室收集與保存 (Cheng *et al*. 2013)；所有供試病毒經接種於 *N. benthamiana* 後作為接種源供後續試驗用。

植株全 RNA 的抽取純化

取 0.1 g 新鮮甜椒葉片，置於液態氮中研磨，並參照市售試劑組 (Trizol Reagent, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 的操作手冊抽取甜椒葉片全 RNA，抽取完成的全 RNA 保存於 -80℃，待後續試驗使用。

Real-time RT-PCR 引子及探針的設計

Real-time RT-PCR 引子是藉由 Primer Express™ (Applied Biosystems, San Francisco, CA, USA) 軟體所設計，並由基龍米克斯生物科技股份有限公司 (台灣新北市) 所合成。引子 (Potyvirus-Nib-350.1-F/R) 可專一性結合於 Nib 基因序列，產物大小為 350 bp (如表 1)。使用由本試驗所設計 2 組 PVY 及 PepMoV 專一性探針，亦即採用 Zheng *et al*. (2008) 使用的 Potyvirus-Nib-350.1-F/R 通用引子對，並由該引子對之增幅核酸區域分別設計 PVY 序列探針及 PepMoV 序列探針，作為引子和探針的設計區段，real-time RT-PCR 螢光探針序列是藉由 Primer Express™ (Applied Biosystems, San Francisco, CA, USA) 軟體所設計，並由 Biosearch Technologies Inc. (Petaluma, CA, USA) 所合成。此專一性螢光探針 (PVY-Nib-350.1-Probe、PEPMOV-Nib-350-Probe 如表 1 所示) 是一段專一性結合於 Nib 基因序列。專一性探針 5’ 和 3’ 端分別標定 FAM (6-carboxy fluorescein excitation wavelength = 494 nm) 螢光物質及 BHQ1 (excitation wavelength = 534 nm) 吸收螢光物質。

RT-PCR 和 real-time RT-PCR 方法

所使用的 RT-PCR 分成 RT 及 PCR 二部分：(1) 於 25 μL RT 反應中，首先加入 2 μg 甜椒葉片全 RNA、1 μL oligo-dT 和 random haxamer 後混合，於 70℃反應 5 min 後放入冰中；之後於原反應管中分別加入 5 μL 之 5× first strand buffer (Promega, Madison, WI, USA)、5 μL 10 mM dNTP, 1 μL MMLV RT (200 U) (Promega)、1 μL Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor (25 U) (Promega)，加無菌水補至 25 μL，反應時間為 60 min 42℃。(2) 於 PCR 反應中，分別加入 2.5 μL 之 10× buffer (Protech, Taipei, Taiwan)、0.5 μL 之 10 mM dNTP、各 0.5 μL 之 0.1 μM Potyvirus-Nib-350.1-F/R 引子、2 μL 的全 RNA 模板、以 ddH_2O 補至 25 μL。PCR 反應條件為 95℃/5 min、30 個循環的 95℃/30 s、55℃/30 s 和 72℃/30 s，72℃/5 min 和 16℃定溫。

Real-time RT-PCR 所使用的藥劑為 KAPA PROBE FAST qPCR Kit (Kapa Biosystem,

表 1. 本試驗所使用之引子與核酸探針。

Table 1. Nucleotide sequences of primers and TaqMan probes used in this study.

Primer/probe	Sequence (5'-3')	Product (bp)	Tm (℃)	Reference
Primers				
Potyvirus-Nib-350.1 (F)	GTGTGTGTWGATGAYYTCAAYAA	350	45	Zheng *et al*. (2008)
Potyvirus-Nib-350.1 (R)	TCYACAACGGTRGAAGGTTGMCC	350	60	Zheng *et al*. (2008)
TaqMan probes				
PVY-Nib-350.1-Probe	Quasar 670-TGGTTGGGATAAATTG CTTCGGCGTC-BHQ-2[z]			This study
PEPMOV-Nib-350-Probe	CAL Fluor Orange 560-CATTCCA ACCGTCCAACAACATTCA-BHQ-1[y]			This study

[z] GenBank Accession no. AB711155.1 (potato virus Y genomic RNA, nearly complete genome).
[y] GenBank Accession no. NC_001517.1 (pepper mottle virus, complete genome).

Wilmington, MA, USA)，在 20 µL 的反應體積中，加入的反應物分別為：KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix (2×) 10 µL、0.1 µM Potyvirus-Nib-350.1-F/R 引子各 2 µL、0.5 µM PVY-Nib-350.1-Probe 探針、0.5 µM PepMoV-Nib-350.1-Probe 探針、ROX Low (50×) 0.4 µL、KAPA RT Mix (50×) 0.4 µL、2 µL 的 cDNA 模板 (等比例混合之 PVY 和 PepMoV cDNA)、以 ddH_2O 補至 20 µL。反應條件為：95℃/3 min，40 個循環的 95℃/15 s、60℃/1 min。Real-time RT-PCR 反應偵測機器為 ABI PRISM® 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, San Francisco, CA, USA)。

RT-PCR 和 real-time RT-PCR 的專一性測定

為測定所設計的引子和探針序列是否對 PepMoV 和 PVY 序列具專一性，以健康甜椒植株葉片和感染不同病毒之煙草葉片組織包括 TMV、ToMV、PMMoV、CMV 和 PVX，抽取煙草全 RNA 進行 RT-PCR 及 real-time RT-PCR 反應，其反應物及條件如前述。

檢測 PVY 和 PepMoV 的靈敏度試驗

為測定所設計的探針應用於本研究之 real-time PCR 對檢測 PVY 和 PepMoV 病毒的靈敏度，本研究使用罹染病毒之植物組織的全 RNA 進行靈敏度試驗。Potyvirus Nib 基因檢測：將 PVY 和 PepMoV 所感染的甜椒病株全 RNA，以 PVY-Nib-350.1-F (5'-GTG TGT GTW GAT GAY YTC AAY AA-3') 和 Potyvirus-Nib-350.1 (R) (5'-TCY ACA ACG GTR GAA GGT TGM CC-3') 引子進行 PCR 反應，反應條件為：95℃/3 min、40 個循環的 95℃/30 s、55℃/30 s 和 72℃/30 s，72℃/5 min 和 16℃定溫，檢測試驗則使用全 RNA (1 ng μL^{-1}) 為模版經 RT 轉為 cDNA 後進行 10× 系列稀釋 (估算 RNA 濃度由 1 ng μL^{-1} 至 10^{-7} ng μL^{-1}) 的方式，取各稀釋液進行 RT-PCR 以及 real-time RT-PCR 反應。另外使用罹染 PVY 和 PepMoV 的甜椒植株全 RNA 做檢測；分別將其全 RNA 以 10× 系列稀釋 (10 ng μL^{-1} 至 0.1 ag μL^{-1}) 的方式，分別取用罹染 PVY 或 PepMoV 的全 RNA，另混合相同濃度 (10 ng μL^{-1}) 之 PVY 和 PepMoV 全 RNA 進行靈敏度試驗，分別進行 RT-PCR 及 real-time RT-PCR 反應，其反應物及條件如前述。

評估以 real-time RT-PCR 檢測 PVY 和 PepMoV 的效率

核酸增幅效率確認包括一系列稀釋以確定多重反應中 PVY 和 PepMoV 引子/探針組合的擴增效率。將同時含有 PVY 和 PepMoV 的總量 RNA 稀釋至 10 ng μL^{-1}，並使用 10× 系列稀釋至 1×10^{-5} ng μL^{-1}。Real-time RT-PCR 擴增時，針對總量 RNA 濃度繪製每種稀釋液的 cycle threshold (Ct) 值。Ct 值大於 35 的稀釋液不包括在結果中。使用增幅效率 $Ex = 10^{(-1/slope)}$ 從圖的斜率計算放大效率 (*Ex*) (Rasmussen 2001)。

結果

Real-time RT-PCR 對 PVY 和 PepMoV 的專一性測定

為確定上述所設計的引子和探針在檢測 PVY 或 PepMoV 樣品的試驗中是否具專一性，以 real-time RT-PCR 方法，分別與 PVY 感染甜椒植株、PepMoV 感染甜椒植株、健康的甜椒、健康的煙草、PVX 感染甜椒植株、CMV 感染甜椒植株、TMV 感染甜椒植株 ToMV 和感染甜椒植株的全 RNA 與 no template control (NTC) 對照組進行 real-time RT-PCR 反應，結果顯示添加兩組探針進行試驗：PVY 感染甜椒之組織具陽性反應 (如圖 1A)，Ct 值為 25.9，而對於其他甜椒病毒如 CMV、TMV、ToMV 和 PVX 及健康的甜椒，與作為負對照組之無菌水皆無反應，PepMoV 感染甜椒之組織具正反應 (如圖 1B)，Ct 值為 28.9，而對於其他甜椒病毒如 CMV、TMV、ToMV 和 PVX 及健康的甜椒，與作為負對照組之無菌水皆無反應，另外混合 PVY 和 PepMoV 病毒 RNA 亦可同時檢測 (如圖 1C) 經由上述試驗顯示，所設計的引子和探針於 real-time RT-PCR 方法試驗皆對 PVY、PepMoV 病毒基因片段具有專一性。

RT-PCR 和 Real-time RT-PCR 對檢測 PVY 和 PepMoV 的靈敏度試驗

探討 RT-PCR 和 real-time RT-PCR 對於檢測 PVY、PepMoV 的靈敏度，針對罹染 PVY 及 PepMoV 的甜椒全 RNA 檢測之。結果顯示以 RT-PCR 方法檢測 PVY、PepMoV 之靈敏度可至 10^{-1} ng (圖 2)；相同樣品以 real-time RT-PCR 方法檢測，靈敏度可至 10^{-3} ng (圖 3)。上述結果顯示，在檢測 PVY、PepMoV 靈敏度上，real-time RT-PCR 方法高於 RT-PCR 100×。將上述 real-time RT-PCR 結果繪製成標準曲線圖 (圖 4)：設定縱座標為 Ct 值，橫坐標為 Potyvirus-Nib-350 RNA 量，則可獲得 PepMoV 標準曲線圖為 R^2 = 0.991 (E = 96.59%)，PVY 標準曲線圖為 R^2 = 0.994 (E = 103.24%)，本試驗結果可應用於定量病毒含量。

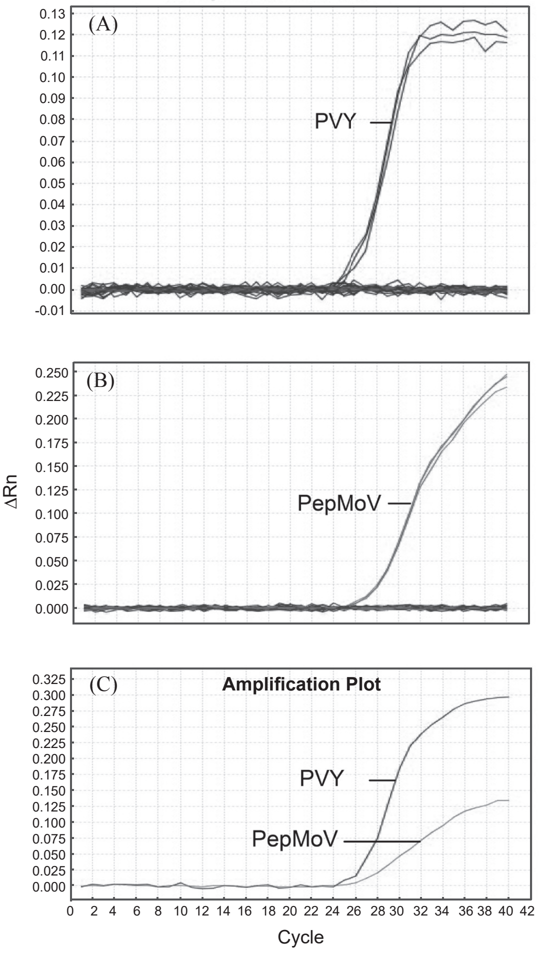

圖 1. Real-time RT-PCR 檢測 PVY 和 PepMoV 的專一性試驗。專一性受試材料顯示與 PVY 或 PepMoV 反應不與 PVX、TMV、ToMV、CMV 和 PMMoV 反應：(A) PVY 病毒檢測；(B) PepMoV 病毒檢測；(C) PVY + PepMoV 病毒檢測。

Fig. 1. Specificity of real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for detection of potato virus Y (PVY) and pepper mottle virus (PepMoV). The specific test of real-time RT-PCR showed that it reacts with PVY or PepMoV and does not react with potato virus X (PVX), tobacco mosaic virus (TMV), tomato mosaic virus (ToMV), cucumber mosaic virus (CMV) and pepper mild mottle virus (PMMoV). (A) PVY detection only; (B) PepMoV detecion only; and (C) analysis for PVY + PepMoV.

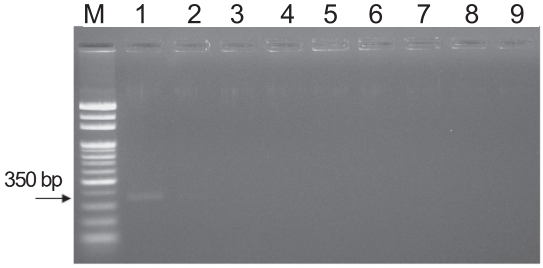

圖 2. RT-PCR 法進行靈敏度試驗檢測 PVY 及 PepMoV 之電泳圖結果。混合 PVY 及 PepMoV 全 RNA 之 10× 系列稀釋液 (1–10^{-7} ng) 為模板。行 M：100 bp 核酸分子標準液；行 1–8 分別為 1–10^{-7} ng 之核酸稀釋液；行 9：NTC。

Fig. 2. Sensitivity detection of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for both potato virus Y (PVY) and pepper mottle virus (PepMoV). Mixed with PVY and PepMoV, 10× serial dilutions of total RNA as templates (1–10^{-7} ng). Lane M: 100 bp marker; lanes 1–8: 1–10^{-7} ng total RNA diluent; and lane 9: no template control (NTC).

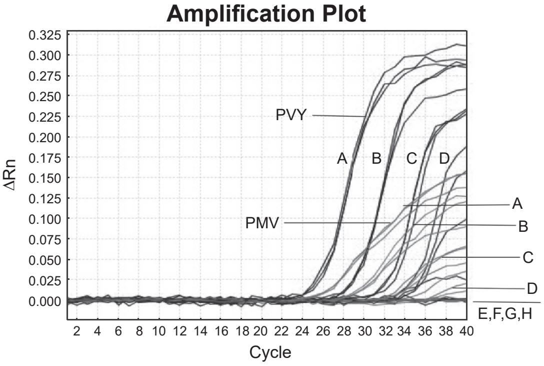

圖3. Real-time RT-PCR法進行靈敏度試驗檢測PVY + PepMoV。縱軸：ΔRn 值；水平軸：Ct 值；10× 系列稀釋之 PVY + PepMoV 全 RNA (A–H：分別表示 1–10^{-7} ng)。

Fig. 3. Sensitivity of real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for detection of potato virus Y (PVY) and pepper mottle virus (PepMoV). Vertical axis: ΔRn value; horizontal axis: cycle threshold (Ct) value; total RNA of PVY + PepMoV (A–H: 1–10^{-7} ng, respectively) by 10× serial dilutions.

評估以 real-time RT-PCR 同時檢測甜椒上 PVY 和 PepMoV 的效率

PVY + PepMoV 的陽性檢出之 RNA 濃度均為 1 × 10^{-3} ng μL^{-1}，PVY 和 PepMoV 的 Ct 值

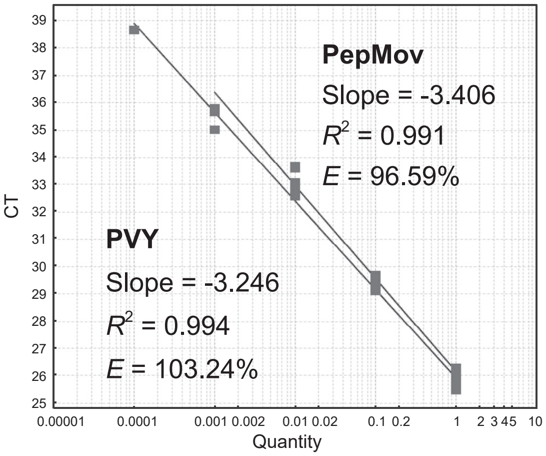

圖 4. Real-time RT-PCR 法檢測經系列稀釋之 PVY + PepMoV 其反應結果的標準曲線。計算其增加濃度與斜率之關係；10× 系列稀釋之 PVY 和 PepMoV 全 RNA (1–10^{-7} ng)。

Fig. 4. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) slope calculation for potato virus Y (PVY) and pepper mottle virus (PepMoV) using the cycle threshold (Ct) slope method with increasing concentrations of total RNA positive for both PVY and PepMoV. The standard curve of real-time RT-PCR experiment results; PVY and PepMoV full RNA (1–10^{-7} ng) in 10× serial dilutions.

分別為 35.7 和 37.7。發現 PVY 的線性斜率為 -3.246，PepMoV 的線性斜率為 -3.406。PVY 和 PepMoV 的擴增效率的計算分別為 103.24% 和 96.59% (如圖 4)。

討論

由於田間生態相多樣性而發生多重病毒混合感染的情形十分普遍，已有許多多重病毒檢測的研究發展以因應此現況。例如：使用 RT-PCR 同時檢測 PVX、 PVY、potato leaf roll virus (PLRV)、和 potato virus S 等 5 種馬鈴薯病毒 (Du *et al*. 2006)；使用免疫磁珠法同時檢測馬鈴薯病毒 PVY、PVX 和 PLRV (Bergervoet *et al*. 2008)；RT-PCR 鑑定 PVY 和 PLRV 等 2 種馬鈴薯病毒 (Klerks *et al*. 2001)；RT-PCR 檢測 TMV、CMV、tomato spotted wilt virus (TSWV)、tomato chlorosis virus (ToCV)、PVY 和 PVX 等 6 種番茄病毒 (Liu *et al*. 2019)。

RT-PCR 同時檢測甜椒 CMV、TMV、PMMoV、PVY 和 TSWV 等 5 種病毒 (Nemes & Salánki 2020)。甜椒在台灣常採用露天或設施栽培，為連續採果作物，且栽培過程需持續摘除側芽，推測可能去芽或採果時，或透過刀具汙染病毒而容易造成病毒傳播。此外，藉由蟲媒傳播的速度甚快，病毒病已成為台灣茄科作物栽培區常發生的病害之一。目前使用簡併式引子對 (degenerate primer) 進行 RT-PCR 方法可用於鑑定 *Potyvirus* 病毒屬，已被使用於茄科病毒檢測 (Gibbs & Mackenzie 1997; Chen & Adams 2001)。本研究使用通用引子對 Potyvirus-Nib-350.1-F/R 以一般 RT-PCR 法檢測結果，顯示只對馬鈴薯 Y 屬病毒 (如 PVY 和 PepMoV) 產生 350 bp 產物，與其他 *Cucumovirus*、*Potexvirus*、*Tobamovirus*、*Carmovirus* 屬之受測病毒皆不反應 (結果未出示)，此序列來自於病毒 Nib 基因序列為高度保留區域，已知可偵測近 40 種 *Potyvirus* isolates，過去文獻報導使用 WCIEN 或 Potyvirus 之引子只能鑑定 50–80% 的 *Potyvirus* isolates；但仍有少數 *Potyvirus* 因僅有外殼蛋白 (coat protein; CP) 基因的資訊，缺乏 Nib 之序列資料，故無法以此基因進行鑑定 (Zheng *et al*. 2010)。於 real-time RT-PCR 檢測結果顯示 (圖 1)：使用 Potyvirus-Nib-350.1-F/R 引子組加上 PVY 與 PepMoV 探針組進行反應，亦僅對罹染 PVY 或 PepMoV 之馬鈴薯 Y 屬病毒之甜椒植株組織有反應，而對健康的甜椒和番茄、罹染 CMV、PVX、TMV、PMMoV 或 ToMV 的甜椒植株組織則均為陰性反應。經由上述兩個試驗結果顯示，本研究所設計的 Potyvirus-Nib-350.1-F/R 引子對以 RT-PCR 及 real-time RT-PCR 方法檢測皆對 PVY 和 PepMoV 病毒基因片段具有專一性。

PVY 和 PepMoV 為常見危害茄科作物的病毒者，在台灣過去的調查發現檢測樣本中，PepMoV 亦常伴隨與不同 *Potyvirus* 屬病毒複合感染 (Cheng *et al*. 2013)。Cheng *et al*. (2013) 利用 PepMoV-TW1 的鞘蛋白製備多元抗血清。此抗血清除與 PepMoV 具強烈反應，但發現與台灣茄科作物常見之 PVY 仍有中強度血清反應，進行 ELISA 檢測時僅藉由光學吸光值之呈色強度加以判別似乎不易區分。因此以 PepMoV 和 PVY 抗血清無法區分 PepMoV 和 PVY 此 2 種病毒。本研究使用 *Potyvirus* 病毒 Nib 基因，針對病毒特異區序列設計出 PVY 及 PepMoV 專一性探針，並可鑑定此 2 種病毒。而本研究利用 PepMoV、PYV RNA 方式進行 real-time PCR 試驗，結果顯示檢測靈敏度可至 10^{-3} ng，並建立 PVY 及 PepMoV 病毒標準曲線。RT-PCR 檢測法之靈敏度可至 10^{-1} ng，本研究結果顯示在檢測 PVY 和 PepMoV 靈敏度上，real-time RT-PCR 方法高於 RT-PCR 100×。此靈敏度在全 RNA 之結果稍低，推測可能與感染植物 PepMoV RNA 含量之多寡有關。經由上述的試驗觀察到設計的引子和探針，不論是 RT-PCR 或是 real-time RT-PCR 可以應用於田間樣品檢測。然而，本研究所設計的引子對屬於簡併式的通用引子對，應用於 RT-PCR 檢測時，具有廣效性檢測同屬不同病毒之效果，均已見諸於國內外報告;就本報告的技術研發上，以 multiplex RT-PCR 技術進行病毒檢測僅需使用一對引子 (primer pair)，本試驗首次應用於 PepMoV 和 PVY 之鑑定，具有操作便利及縮短個別病毒鑑定流程之優點；另外，此技術亦說明可以在同屬病毒間序列十分相似的區域裡找出相異的序列，作為區分不同種的鑑別技術。由本研究結果顯示，real-time RT-PCR 對於 *Potyvirus* 的檢出率高於 RT-PCR，且由結果推測 real-time PCR 法在低濃度之 PYV 感染植株中，仍具有可檢測出此病毒之優點，因此利用 real-time PCR 法，將有助於作為田間病害早期診斷之依據。

引用文獻

Abdalla, O. A., P. R. Desjardins, and J. A. Dodds. 1991. Identification, disease incidence, and distribution of viruses infecting peppers in California. Plant Dis. 75:1019–1023. doi:10.1094/PD-75-1019

Benner, C. P., C. W. Kuhn, J. W. Demski, J. W. Dobson, P. Colditz, and F. W. Nutter. 1985. Identification and incidence of pepper viruses in northeastern Georgia. Plant Dis. 69:999–1001.

Bergervoet, J. H., J. Peters, J. R. van Beckhoven, G. W. van den Bovenkamp, J. W. Jacobson, and J. M. van der Wolf. 2008. Multiplex microsphere immuno-detection of potato virus Y, X and PLRV. J. Virol. Methods. 149:63–68. doi:10.1016/j.jviromet.2008.01.020

Chen, J. and M. J. Adams. 2001. A universal PCR primer to detect members of the Potyviridae and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. Arch. Virol. 146:757–766. doi:10.1007/s007050170144

Cheng, Y. H., R. Y. Wang, C. C. Chen, C. A. Chang, and F. J. Jan. 2009. First report of *Pepper veinal mottle virus* in tomato and pepper in Taiwan. Plant Dis. 93:107. doi:10.1094/PDIS-93-1-0107A

Cheng, Y. H., T. C. Deng, C. C. Chen, J. Y. Liao, C. A. Chang, and C. H. Chiang. 2011. First report of *Pepper mottle virus* in bell pepper in Taiwan. Plant Dis. 95:617. doi:10.1094/PDIS-10-10-0721

Cheng, Y. H., T. C. Deng, C. C. Chen, C. P. Kuan, and C. A. Chang. 2013. Identification and occurrence of *Pepper mottle virus* isolated from peppers in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 62:360–371. doi:10.6156/JTAR/2013.06204.06 (in Chinese with English abstract)

Crosslin, J. M. 2012. PVY: An old enemy and a continuing challenge. Amer. J. Potato Res. 90:2–6. doi:10.1007/s12230-012-9286-8

Dietzgen, R. G. and J. E. Thomas. 1991. Properties of virus-like particles associated with banana bunchy top disease in Hawaii, Indonesia and Tonga. Aust. Plant Pathol. 20:161–165. doi:10.1071/APP9910161

Du, Z., J. Chen, and C. Hiruki. 2006. Optimization and application of a multiplex RT-PCR system for simultaneous detection of five potato viruses using 18S rRNA as an internal control. Plant Dis. 90:185–189. doi:10.1094/PD-90-0185

Gibbs, A. and A. Mackenzie. 1997. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. J. Virol. Methods 63:9–16. doi:10.1016/S0166-0934(96)02103-9

Gyoutoku, Y., S. Okazaki, A. Furuta, T. Etoh, M. Mizobe, K. Kuno, S. Hayashida, and M. Okuda. 2009. Chlorotic yellows disease of melon caused by *Cucurbit chlorotic yellows virus* a new crinivirus. Jpn. J. Phytopathol. 75:109–111. doi:10.3186/jjphytopath.75.109

Han, J. H., H. S. Choi, D. H. Kim, H. R. Lee, and B. D. Kim. 2006. Biological, physical and cytological properties of pepper mottle virus-SNU1 and its RT-PCR detection. Plant Pathol. J. 22:155–160.

Kim, M. S., M. J. Kim, J. S. Hong, J. K. Choi, and K. H. Ryu. 2009. Patterns in disease progress and the influence of single and multiple viral infections on pepper (*Capsicum annuum* L.) growth. Eur. J. Plant Pathol. 127:53–61. doi:10.1007/s10658-009-9570-8

Klerks, M. M., G. O. Leone, M. Verbeek, J. F. van den Heuvel, and C. D. Schoen. 2001. Development of a multiplex AmpliDet RNA for the simultaneous detection of *Potato leafroll virus* and *Potato virus Y* in potato tubers. J. Virol. Methods. 93:115–125. doi:10.1016/s0166-0934(01)00258-0

Kubota, K., T. Usugi, and S. Tsuda. 2011. Production of antiserum and immuno- detection of *Cucurbit chlorotic yellows virus*, a novel whitefly-transmitted crinivirus. J. Gen. Plant Pathol. 77:116–120. doi:10.1007/s10327-010-0287-5

Lee, S. T. 1970. Studies on some naturally occurring strains of *Potato virus Y* in Taiwan. Plant Prot. Bull. 12:41–50. (in Chinese)

Liu, H., K. Wu, W. Wu, W. Mi, X. Hao, and Y. Wu. 2019. A multiplex reverse transcription PCR assay for simultaneous detection of six main RNA viruses in tomato plants. J. Virol. Methods. 265:53–58. doi:10.1016/j.jviromet.2018.12.011

Mackay, I. M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 10:190–212. doi:10.1111/j.1198-743x.2004.00722.x

Nemes, K. and K. Salánki. 2020. A multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection of prevalent viruses infecting pepper (*Capsicum annuum* L.). J. Virol. Methods. 278:113838. doi:10.1016/j.jviromet.2020.113838

Purcifull, D. E., T. A. Zitter, and E. Hiebert. 1975. Morphology, host range, and serological relationships of pepper mottle virus. Phytopathology 65:559–562. doi:10.1094/Phyto-65-559

Quenouille, J., N. Vassilakos, and B. Moury. 2013. *Potato virus Y*: A major crop pathogen that has provided major insights into the evolution of viral pathogenicity. Mol. Plant Pathol. 14:439–452. doi:10.1111/mpp.12024

Rasmussen, R. 2001. Quantification on the LightCycler. p.21–34. *in*: Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications (Meuer, S., C. Wittwer, and K. I. Nakagawara, eds.) Springer. Heidelberg, Germany. 408 pp.

Scholthof, K. B. G., S. Adkins, H. Czosnek, P. Palukaitis, E. Jacquot, T. Hohn, B. Hohn, K. Saunders, T. Candresse, P. Ahlquist, C. Hemenway, and G. D. Foster. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. Mol. Plant Pathol. 12:938–954. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x

Shukla, D. D., C. W. Ward, and A. A. Brunt. 1994. The Potyviridae. CAB International. Wallingford, CT. 516 pp.

Zheng, L., P. J. Wayper, A. J. Gibbs, M. Fourment, B. C. Rodoni, and M. J. Gibbs. 2008. Accumulating variation at conserved sites in potyvirus genomes is driven by species discovery and affects degenerate primer design. PLoS ONE 3:e1586. doi:10.1371/journal.pone.0001586

Zheng, L. B., C. Rodonibc, M. J. Gibbsab, and A. J. Gibbsd. 2010. A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. Plant Pathol. 59:211–220. doi:10.1111/j.1365-3059.2009.02201.x

Development of Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction to Identify and Detect Potato Virus Y and Pepper Mottle Virus in Sweet Pepper

Cheng-Ping Kuan[1,*], Ying-Huey Cheng[2], Chia-Hsin Tsai[3], Ching-Shan Tseng[1], and Tso-Chi Yang[4]

Abstract

Kuan, C. P., Y. H. Cheng, C. H. Tsai, C. S. Tseng, and T. C. Yang. 2022. Development of real-time reverse transcription-polymerase chain reaction to identify and detect potato virus Y and pepper mottle virus in sweet pepper. J. Taiwan Agric. Res. 71(1):11–18.

The real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method was, for the first, developed to identify and differentiate potato virus Y and pepper mottle virus in sweet pepper. The results showed that this nucleic acid amplification technology can simultaneously detect both potato virus Y and pepper mottle virus. No amplification was obtained from other *Solanaceae* viruses and healthy plants. The method can be used to identify single or multiple infections. The results indicated that this quantitative RT-PCR has the advantages of good specificity and high sensitivity. The technology will be applied to assess field surveillance for sweet pepper.

Key words: Potato virus Y, Pepper mottle virus, Detection, Real-time RT-PCR.

Received: April 14, 2021; Accepted: October 12, 2021.
* Corresponding author, e-mail: pcr123@tari.gov.tw
1 Associate Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
2 Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
3 Assistance Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
4 Research Fellow and Division Director, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 71(1):19–34 (2022)
DOI:10.6156/JTAR.202203_71(1).0003

研究報告

由 *Pseudoidium neolycopersici* 引起之番茄白粉病鑑定與商業品種之感病性評估

戴裕綸 [1]　黃晉興 [2]　蔡志濃 [3]　林筑蘋 [4,*]

摘要

戴裕綸、黃晉興、蔡志濃、林筑蘋。2022。由 *Pseudoidium neolycopersici* 引起之番茄白粉病鑑定與商業品種之感病性評估。台灣農業研究 71(1):19–34。

於台灣中部網室栽培的大果番茄品種觀察到 3 類型白粉病病徵，分別描述如下，類型 1：於葉正面呈現典型白色粉狀病斑，並可見大量孢子；類型 2：於葉正面呈現黃化不規則暈斑和壞疽，並於相應之葉背可見些許孢子；類型 3：於葉正面呈現圓形到不規則狀之褐化壞疽，並可見些許孢子。經由光學顯微鏡下觀察病徵上之病兆，可見無性世代之分生孢子但並無發現有性世代之子囊孢子，利用番茄葉圓片分別對不同病徵上之病原菌進行單孢培養以供鑑定和病原性測試，依據形態特徵與 internal transcribed spacer (ITS) 序列親緣演化分析，分離菌株皆鑑定為 *Pseudoidium neolycopersici*。病原菌接種試驗結果顯示，類型 1 病徵產生在接種點位於葉正面，類型 2 病徵產生在接種點位於葉背，類型 3 病徵發生在環境溫度和相對濕度變化較大時。此外，分離株於所有受試的大果番茄品種 (「綠鑽石」、「金吉利」、「農友 301」和「鐵娘」) 皆能在葉部造成嚴重的病徵並產生大量孢子，相對於小果番茄品種 (「美女」、「玉女」、「麗金」和「金瑩」) 除了「嬌女」跟大果番茄一樣呈現強烈感病外，其他則病徵輕微且產孢少。本篇為台灣首次確認 *P. neolycopersici* 引起番茄白粉病及其病徵之正式報導。

關鍵詞：白粉病、鑑定、病徵、*Pseudoidium neolycopersici*。

前言

白粉病 (powdery mildew) 為活體營養之病原菌，在許多農、園藝作物上都會造成危害，已知有近 700 種白粉病菌可引起白粉病，發生在大約 7,600 種被子植物上 (Ridout 2009)。目前在全球曾被記錄可感染番茄 (*Solanum lycopersicum* L.) 的白粉病菌種約有 6 種 (Kiss *et al*. 2001; Tzean *et al*. 2019)，其中 *Pseudoidium neolycopersici* (L. Kiss.) L. Kiss. (syn. *Oidium neolycopersici* L. Kiss.) 除了發生地域範圍大 (Kiss *et al*. 2001)，寄主範圍亦廣 (Whipps 1998)，因此在經濟生產上具有潛在的威脅性。*P. neolycopersici* 感染番茄時於葉表面形成白色粉狀黴物，其同時也能危害葉背、葉柄、莖和花萼，嚴重感染時導致葉片提早老化，雖然不能感染果實，但可能間接造成果實萎縮 (Jones *et al*. 2001)。溫室若無有效防治，罹病率可達 90% (Stevanović *et al*. 2012)，而因嚴重感染白粉病致使提早落葉，可能造成植株整體葉面積減少 50–60%，甚至能造成 20% 左右的果實產量損失 (Chelal & Hau 2015)。

P. neolycopersici 白粉病菌於 1970 年代末即曾在番茄產業大發生，諸如在日本、北美和

投稿日期：2021 年 8 月 18 日；接受日期：2021 年 10 月 12 日。
* 通訊作者：cplin@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組計畫助理。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所植物病理組研究員。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。

歐洲等地都有相關報導，其危害範圍廣布全球以經濟生產為目的之溫室或田間，然而因命名問題、缺乏有性世代導致鑑定混淆等因素，一直到 Kiss *et al*. (2001, 2005) 對當時發生之白粉病標本、新鮮樣本和文獻重新進行詳盡之形態和分子鑑定，才最終得以確認危害的病原菌種類。近 10 年來，韓國 (Park *et al*. 2010)、塞爾維亞 (Stevanović *et al*. 2012) 和南非 (Lebeda *et al*. 2015) 等地仍陸續有 *P. neolycopersici* 相關之發現報導，顯見 *P. neolycopersici* 在番茄上仍為值得注意的病原菌之一。

台灣番茄曾經記錄的白粉病菌包含 *Golovinomyces orontii* (Castagne) V. P. Heluta (syn. *Erysiphe orontii* Castagne)、*G. cichoracearum* (DC.) V. P. Heluta (syn. *E. cichoracearum* DC.) 和 *Leveillula taurica* (Lév.) G. Arnaud 等 (Tzean *et al*. 2019; Lin *et al*. 2022)，而 2005 年曾有關於 *P. neolycopersici* 相關防治報導 (Hsieh *et al*. 2005)，但並無正式文獻詳細描述其發生、病徵和病原菌形態。

為達防治目的，抗病育種為一常見手段之一。目前世界上多數番茄商業栽培品種幾乎都能被 *P. neolycopersici* 白粉病菌感染，只是存在罹病度 (disease severity) 上的差異 (Matsuda *et al*. 2001; Lebeda *et al*. 2014; Arushi & Banyal 2018)，因此育種學家將目標轉移到具有抗病潛力的部分野生茄科植物，如 *S. habrochaites* S. Knapp & D. M. Spooner 與 *S. pennellii* Correll 等 (Lebeda *et al*. 2014)。抗病性植株在白粉病菌入侵前可能在菌絲與葉表接觸面產生乳突 (papilla) 形成物理和化學屏障 (Ridout 2009)，或者在病原菌入侵過程吸器形成前後，產生過敏性反應阻止病原菌擴展 (Mieslerová *et al*. 2004; Matsuda *et al*. 2005)，抑或是感染後使菌絲生長明顯受限且不產孢 (Lindhout *et al*. 1993) 等。另外，部分學者也觀察到相同番茄品種在不同來源白粉病分離株接種下出現不一樣的結果，如日本分離株 *P. neolycopersici* KTP-01 即可嚴重感染原本應具有高度抗性的荷蘭抗病品種番茄 ‘Grace’ (De Ruiter Seeds, Bleiswijk, The Netherlands) (Kashimoto *et al*. 2003b)；又或者寄主範圍試驗結果中呈現完全相反或不一致的抗感病性，如：Whipps *et al*. (1998) 報導 *P. neolycopersici* 可以感染葫蘆科作物，但在 Fletcher *et al*. (1988) 或 Kashimoto *et al*. (2003a) 的試驗結果則否，此也進一步顯示 *P. neolycopersici* 在種間可能存在不同品系 (race) 或病原型 (pathotype)。

本研究於 2019–2021 年間於台中市 (霧峰區、烏日區)、南投縣 (信義鄉)、彰化縣 (北斗鎮) 以及雲林縣 (莿桐鄉) 等地之溫網室或露天栽培之牛番茄和玉女番茄上觀察到類型不同白粉病病徵，蒐集病原菌以形態與分子特徵進行鑑定。另外，為瞭解不同品種番茄對白粉病菌的感病性是否具有差異，本研究蒐集台灣各商業品種番茄並進行對白粉病菌的感病性測試。

材料與方法

供試作物之栽培、葉圓片製備

供試作物栽培：將金吉利番茄 (大果品種) 種子直播於裝有泥炭土之穴盤，置於恆溫 24℃、光照 12 h 之走入式生長箱，於 2 wk 後挑取順利發芽的健康植株移植至 4 吋裝有泥炭土之塑膠盆。待植株生長 5–6 wk，即用於病原菌接種和葉圓片製備。

葉圓片製備：剪取株齡 5–6 wk 的番茄中、上位葉片，並以自來水清洗掉粉塵，再用 1% 次氯酸鈉進行表面消毒 20–30 s、3 次無菌水漂洗後，用滅菌過之紙巾吸乾葉面自由水。以直徑 1.5 cm 打孔器切取葉圓片，將葉圓片葉面朝上放置於含有 2 層濾紙之直徑 9 cm 塑膠培養皿中，添加約 4 mL 含有 50 mg L^{-1} tetracyclin 之 M-solution (mannitol 10,000 mg L^{-1}, benzimidazole 30 mg L^{-1}) 使濾紙濕潤至有些許自由水，以保持葉圓片活性 (Huang *et al*. 2009)。

番茄白粉病樣本蒐集與病原菌純化培養

本研究供試菌株個別分離自霧峰網室牛番茄病徵類型 1、2、3 (圖 1) 和玉女番茄 (圖 2) 之白粉病菌株，將樣本於解剖顯微鏡下以單根毛髮夾為工具挑取孢子串至上述葉圓片裝置 (Huang *et al*. 2009)，於恆溫 24℃、光照 12 h 之生長箱中培養，2 wk 後再挑取葉圓片上單

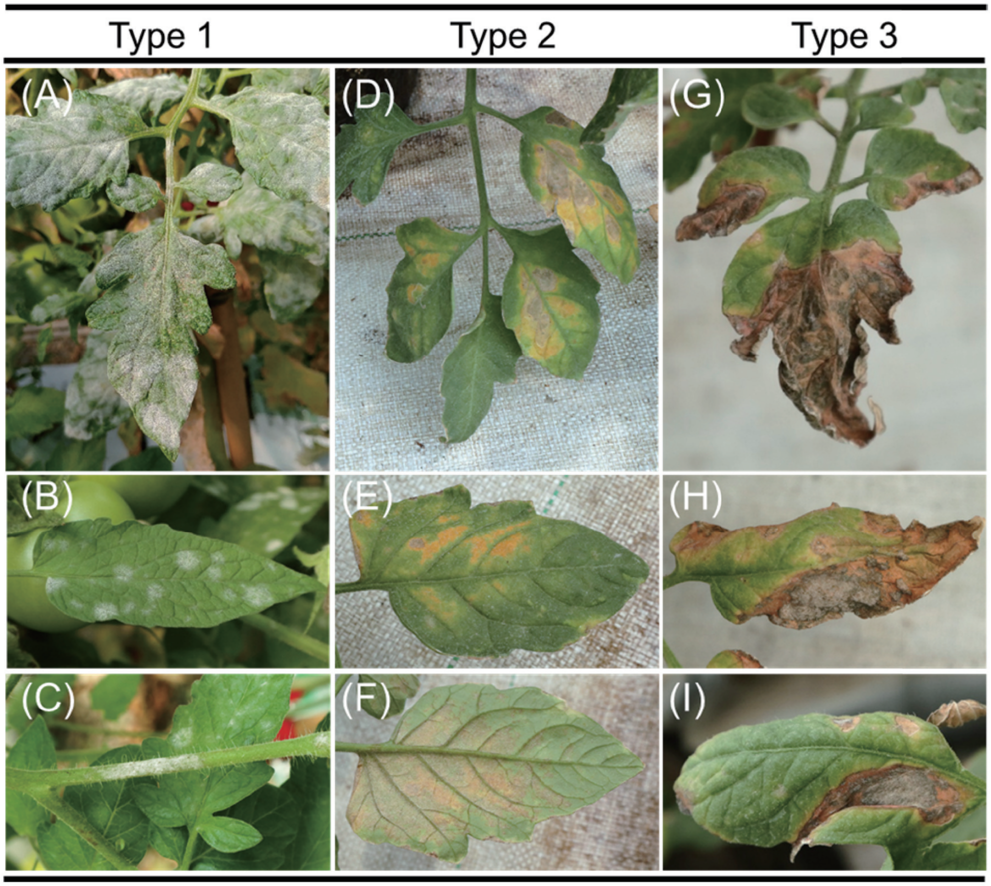

圖 1. 白粉病菌 *Pseudoidium neolycopersici* 於田間大果番茄 (未記錄品種) 上造成之 3 類型病徵。(A–C) 類型 1，白色粉狀病斑於葉上表面、葉柄或莖上出現；(D–F) 類型 2，鮮黃色暈斑於葉上表面出現，部分中心壞疽，於葉下表面可見病兆；(G–I) 類型 3，圓形或不規則形壞疽於葉上表面出現，巨觀上病兆較少，有時不可見。

Fig. 1. Three types of symptoms caused by *Pseudoidium neolycopersici* on large fruit tomatoes in the field. (A–C) type 1 symptom showed white circular pustules on the upper side of leaves, as well as the surface of petioles and stems; (D–F) type 2 symptom was brightly halo–yellow lesion with central necrosis on the upper side of leaves. Powdery mildew fungi were found on the lower side of leaves; and (G–I) type 3 symptom was circular or irregular lesions on the upper side of leaves, and sign of powdery mildew was rarely found.

一孢子重複上述方式進行單孢純化培養，並以接種後具有明顯產孢之葉圓片塗抹新葉圓片的方式持續繼代，以備試驗使用。最終分離純化菌株為 TARI_PM-1 (來自玉女番茄葉正面)、TARI_PM-2 (來自牛番茄葉正面類型 1 病徵)、TARI_PM-5 (來自牛番茄葉背類型 2 病徵) 和 TARI_PM-7 (來自牛番茄葉正面類型 3 病徵)。

病原菌形態鑑定

將供試菌株接種於葉圓片，在恆溫 24℃、光照 12 h 之生長箱中培養 2 wk，其後挑取病兆在光學顯微鏡下觀察，進行形態特徵的測量和紀錄，包含：孢子長、寬、長寬比及其形態，產孢梗、足細胞 (foot cell) 長度、following cell 數量、菌絲附著器 (hyphal appressoria) 形態等特徵。另外於 9 cm 玻璃培養皿中由下而上依序放置經高壓滅菌之濾紙、三角玻棒、載玻片，加入適量無菌水潤濕濾紙製造濕室，再以接種 2 wk 後具明顯產孢之葉圓片輕觸玻片使分生孢子沾附，於 24℃、無光照 24 h

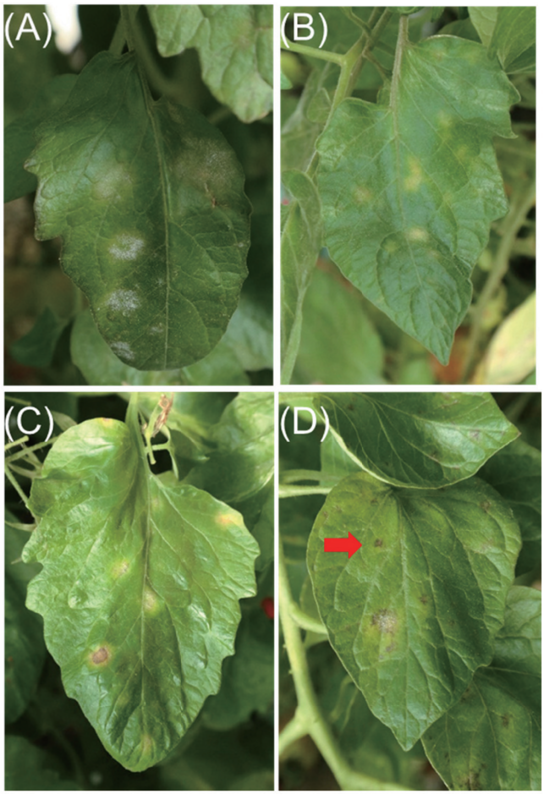

圖 2. 白粉病菌 *Pseudoidium neolycopersici* 於田間感染小果番茄 (「玉女」品種) 之病徵。於病原菌感染處可觀察到 (A) 白色粉狀病斑；(B、C) 淺黃；(D，箭頭處) 紫色小斑；(C) 部分病斑中心壞疽而無明顯產孢。

Fig. 2. Symptoms of tomato powdery mildew caused by *Pseudoidium neolycopersici* on cherry tomatoes (cv. 'Jade Girl') in the field. (A) white-powdery; (B, C) light-yellow; or (D; indicated with an arrow) purple tiny spots occurred on infection sites of leaves; (C) some spots appeared with central necrosis, and little or no sporulation of pathogen could be observed.

後觀察孢子發芽方式及孢子附著器 (conidial appressoria) 形態。形態鑑定參照 *Taxonomic Manual of the Erysiphales (Powdery Mildews)* 之檢索表 (Braun & Cook 2012) 進行無性態形態鑑定。

病原菌分子鑑定

gDNA 抽取：切取含有番茄白粉病菌之葉片至適量大小，以液態氮在研缽下將組織連同病兆進行研磨，其後添加 500 µL CF buffer (農業試驗所配方) 使組織粉末均勻溶於其中，再用微量吸管將溶液吸取至 1.5 mL 離心管，以 12,000× *g* 離心 10 min。取 200 µL 離心後之上清液至新的 1.5 mL 離心管，在 100℃進行乾浴 10 min，即完成 gDNA 萃取，將核酸以 Milli-Q (MQ) 水稀釋 10× 後放置於 -20℃保存備用。

rDNA internal transcribed spacer (ITS) 序列增幅與定序：將供試菌株萃取之 gDNA 進行聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR)，增幅 rDNA ITS 片段。PCR 反應之混合物及進行流程，以下列成分濃度及流程進行：反應混合液含 10 µL 的耐熱聚合酶預混組 (Taq DNA polymerase 2× Master Mix RED, Ampliqon, Odense, Denmark)，1 µL 的 DNA template，10 um 的 primer 各 1 µL，primer 分別為 PMITS1 (5'-TCGGACTGGCCTCAGGGAGA-3') 和 PMITS2 (5'-TCACTCGCCGTTACTGAGGT-3') (Cunnington *et al*. 2003)，並添加 7 µL MQ 水使其最終為 20 µL。ITS 反應流程為：95℃解旋反應 (denature) 5 min；95℃解旋反應，52℃黏合反應 (annealing)，72℃延長反應 (extension) 等各 30 s，進行 35 次循環；最後以 72℃、7 min 進行最終延長反應。將 PCR 產物進行膠體電泳確認後，送交源資國際生物股份有限公司 (台灣新北市) 進行定序。使用 BioEdit v7.2.5 軟體 (Hall 1999) 將定序後之 ITS 原始序列兩端訊號不穩定的部分去除，再將正、反股引子解序出的序列進行疊合以獲得最終定序結果。

親緣關係樹分析：親緣演化分析使用共 21 株菌株，包含本試驗分離之 3 株供試菌株，和 18 株由 GenBank 取得序列之參考菌株 (reference strain) (表 1)。將序列以 MEGA X 軟體 (Kumar *et al*. 2018) 進行排列分析 (alignment)，再透過人工方式進行微調，最終序列用以構築 ITS 單基因親緣關係樹。ITS 親緣關係樹建構使用 MEGA X 軟體進行，選擇最大似然法 (maximum likelihood method; ML) 進行演算，並透過 MEGA X 中的 Find Best DNA/

表 1. 本研究用於建構 internal transcribed spacer (ITS) 親緣關係樹之菌株。

Table 1. The isolates of powdery mildew fungi used for phylogenetic analysis in this study.

Species	Herbarium accession no.[z]	Isolates	GenBank accession no.	Reference
Erysiphe aquilegiae	VPRI21046	-	AF154322	Kiss *et al*. (2005)
E. aquilegiae	TPU495; MUMH98	-	AB015929	Kiss *et al*. (2005)
E. aquilegiae	-	-	AB000944	Kiss *et al*. (2005)
E. blasti	MUMH2	-	AB015918	Kiss *et al*. (2005)
E. glycines	MUMH56	-	AB015934	Kiss *et al*. (2005)
E. glycines	MUMH52	-	AB015927	Kiss *et al*. (2005)
E. huayinensis	MUMH30S	-	AB015914	Kiss *et al*. (2005)
E. hypophylla	VPRI22120	-	AF298544	Kiss *et al*. (2005)
E. magnifica	-	-	AF011312	Kiss *et al*. (2005)
E. macleayae	TPU1873; MUMH54s	-	AB016048	Kiss *et al*. (2005)
E. symphoricarpi	BPI747015	-	AB078969	Kiss *et al*. (2005)
E. symphoricarpi	MUMH1428	-	AB078970	Kiss *et al*. (2005)
E. weigelae	TPU1669	-	AB015931	Kiss *et al*. (2005)
E. weigelae	MUMH10s	-	AB015932	Kiss *et al*. (2005)
Pseudoidium neolycopersici (syn. *Oidium neolycopersici*)	-	KTP01	AB094991	Kashimoto *et al*. (2003b)
P. neolycopersici	VPRI20381	UK2	AB163916	Kiss *et al*. (2005)
P. neolycopersici	BPI747013	Et1	AF229019	Kiss *et al*. (2005)
P. neolycopersici	BPI746232	MD1	AB163915	Kiss *et al*. (2005)
P. neolycopersici	-	TARI_PM-1	MT370492	This paper
P. neolycopersici	F0034681	TARI_PM-2	MT370493	This paper
P. neolycopersici	-	TARI_PM-5	MZ540810	This paper

[z] VPRI = Plant Disease Herbarium, Institute for Horticultural Development, Victoria, Australia; TPU = Toyama Prefectural University Herbarium, Japan; MUMH = Mie University Mycological Herbarium, Japan; BPI = U.S. National Fungus Collection, Beltsville, MD; F = National Museum of Natural Science, Taiwan.

Protein Models 的功能選項進行最佳取代模型 (substitution model) 的分析，其中空格 (gaps) 和遺失資料 (missing data) 完全去除，分支的支持度以拔靴法 (bootstrap method) 進行 1,000 次重複取樣來檢驗。

病原性測試

將接種供試菌株 TARI_PM-2 達 2 wk 之葉圓片以無菌水洗下孢子，製備成 5×10^5 conidia mL^{-1} 孢子懸浮液，噴霧接種於 5 wk 大之金吉利番茄，接種部位分為葉正面、葉背兩種，對照組則為無菌水同時接種於葉上、下兩面，各處理為 8 植株。接種後將植株置於走入式生長箱 (24℃，12 h 光照)，套袋 1 d，於第 10 天時，將不同接種部位處理之植株數量對半，分為繼續放置在走入式生長箱或移置溫室不同環境處理，並於接種後 10、14、19、24 d (days post inoculation; dpi) 進行病徵觀察和記錄，試驗共進行 3 次。

商業品種番茄對 *P. neolycopersici* 感病性試驗

試驗期間為 2020 年 11 月初到 2020 年 12 月中旬 (環境溫度 20–28℃，平均 24℃)，共進行 3 次。

供試作物品種及來源：試驗使用番茄品種

總共為 9 種，包含大果類：「綠鑽石」(‘Lu Zuan Shi’)、「金吉利」(‘Golden Lucky’)、「農友 301」(‘Farmers 301’) 和「鐵娘」(‘Sensation’)；小果類：「嬌女」(‘Jolly’)、「美女」(‘Beauty’)、「玉女」(‘Jade Girl’)、「麗金」(‘Li Jin’) 和「金瑩」(‘Golden Sweet’)。「玉女」品種為直接購買種苗，其他品種則以種子直播於泥炭土，待植株 2 wk 大時以 4 吋盆定植於溫室，以備後續試驗使用。

病原菌接種：接種源包含人工接種源和植株定植期間溫室自然感染源 (經形態確認為 *P. neolycopersici*)。人工接種源菌株使用 TARI_PM-2，首次之接種以葉圓片法製備 2 × 10^4 conidia mL^{-1} 孢子懸浮液，於玉女品種定植後 2 wk，其他品種為株齡 5–6 wk 時進行噴霧接種，其後之接種則從前次接種試驗感染植株以無菌水洗下分生孢子製備為下批次人工接種源。

罹病度調查：調查前採樣鏡檢確認白粉病菌形態與 *P. neolycopersici* 相符，且無其他種之複合感染。植株由下而上調查 3 複葉 (小葉數 < 5 之複葉不列入計算)，每複葉計算得一罹病度，取 3 複葉罹病度平均為該植株罹病度，每品種含 4 重複，以計算品種平均罹病度和標準誤差 (standard error; *SE*)。罹病度級數 (disease index) 和計算方式如下：0 級：無任何病徵；1 級：感染 0–25% 面積，僅出現黃化或產孢不明顯；2 級：感染 0–25% 面積，產孢明顯或感染 26–50% 面積，產孢不明顯；3 級：感染 26–50% 面積，產孢明顯或感染 51–90% 面積，產孢不明顯；4 級：感染 51–90% 面積，產孢明顯或感染 91–100% 面積，產孢不明顯；5 級：感染 91–100% 面積，產孢明顯或葉片萎凋面積 > 50%；複葉罹病度 (%) = [Σ(罹病指數 × 該指數之罹病小葉數)/(調查總小葉數 × 5)] × 100%。

網室內番茄自然感染 *P. neolycopersici* 之罹病度調查

於 2021 年 1 月下旬，在台中市霧峰區農業試驗所的牛番茄「402」品種 (可樂種苗園提供，台灣嘉義縣) 與玉女番茄混種網室進行白粉病罹病度調查與病徵觀察，植株定植後約 3 mo，種植期間無進行任何藥劑管理和人工接種，調查前採樣並於實驗室鏡檢確認形態符合 *P. neolycopersici*，且無其他種之複合感染。牛番茄/玉女品種分別有 84/48 株，由下而上分別對第 1、3、5、7 複葉進行罹病度調查 (小葉數 < 5 之複葉不列入計算)。每複葉計算得一罹病度，取 4 複葉罹病度平均為該植株罹病度，每品種間隔取樣 15 株，以計算品種平均罹病度和標準差。罹病度級數和計算方式參照上述試驗。

統計分析

本研究試驗數據以 SAS® Enterprise Guide® 8.2 版統計軟體 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 進行單因子變異數分析法 (one-way analysis of variance; one-way ANOVA)，並以最小顯著差異性測驗 (Fisher’s protected least significant difference test; LSD test) 在 5% 信心水準下 ($P < 0.05$) 比較處理間平均值之差異。

結果

病徵描述

自 2019 年 12 月到 2020 年 5 月下旬，分別於台中市的霧峰、烏日區，以及南投縣的信義鄉、彰化縣的北斗鎮、雲林縣的莿桐鄉等地栽植番茄的溫、網室中觀察到受白粉病菌感染之牛番茄或玉女番茄植株，經顯微鏡初步觀察發現病原菌具有相似形態，但依據番茄品種、病原菌初始感染部位與環境不同呈現不一樣之病徵，其田間病徵描述如下。

牛番茄受害植株病徵可分為 3 類型：類型 1，葉正面 (又稱「近軸面」，adaxial surface) 感染，於葉面形成白色圓斑，具粉粒質感白粉，病斑可互相癒合，造成白色粉末覆蓋全葉，後期葉面黃化、甚至褐化壞疽進而導致葉枯或落葉，莖部亦可受感染，於莖表面產生白色圓形或長直形具粉粒質感病斑 (圖 1A–C)；類型 2，葉背 (遠軸面，abaxial surface) 感染，於葉正面未出現典型白色粉末，反之葉背則可見淺薄之白色粉狀物覆蓋。病兆對應處葉正面呈鮮黃色、病健交接處不明顯之暈斑，危害後期部分病斑中央出現褐色凹陷壞疽 (圖 1D–F)；類型 3，葉正面可見不明顯的白粉病病兆，病

斑呈褐色或紅褐色，圓形到不規則，白色粉末隨病勢發展漸不明顯，病斑中央呈現棕褐色或黑褐色之壞疽，有時仍會擴大導致葉枯 (圖 1G–I)。調查田區中，類型 1 與 2 病徵於 12 月至隔年 5 月皆可見，類型 3 病徵則僅於 5 月回暖時觀察到。

玉女番茄初期感染時，相對於牛番茄上的病徵呈現覆蓋葉面或產孢良好之單一病斑，玉女番茄上的病徵較為多種，但普遍病斑較小或受限。玉女番茄上白粉病徵包含明顯到淺薄之白色粉粒 (圖 2A)；淺綠或黃化暈斑，中央有時可見褐色壞疽 (圖 2B–C)；亦有部分病斑僅為紫褐色細小病斑，不見病兆擴大 (圖 2D)。

形態和 ITS 分子鑑定為 *P. neolycopersici*

自出現病徵的玉女番茄和具有病徵類型 1、2 與 3 的牛番茄葉片上分離得白粉病分離菌株 TARI_PM-1、TARI_PM-2、TARI_PM-5 和 TARI_PM-7，4 者無性世代形態特徵相似 (表 2)，而無論在田間樣本或人工接種之病兆上皆無觀察到有性世代。以 4 菌株平均值和極限值為代表描述如下：菌絲主要表生，有隔，菌絲附著器 (hyphal appressoria) 單生或對生，形態包含乳突狀 (nipple-shaped) 到多裂瓣狀 (multilobed) (圖 3I–L)；產孢梗 (conidiophore) 直立，足細胞為柱狀 (cylindrical)，長 × 寬為 29.0–(44.3)–64.0 × 7.6–(8.3)–10.6 μm [min.–(avg.)–max.]，基部偶爾可見縊縮，有 1–2 個 following cells (圖 3A–B)；孢子透明無色不具隔，其內不含纖維狀顆粒體 (fibrosin bodies)，外觀呈桶狀 (doliiform; barrel-shaped)、卵形 (ovoid) 到橢圓形 (ellipsoid) 或柱狀 (subcylindrical)，大小為 29.0–(39.4)–53.3 × 13.7–(19.2)–24.4 μm，長寬比則為 1.5–(2.1)–3.1 (圖 3C–H)。孢子形成方式為頂生單一成熟孢子 (pseudoidium type)，然在葉圓片裝置或部分田間樣本中以解剖顯微鏡直接觀察可見成串孢子相連於產孢梗頂端，形成假鏈生 (pseudochain) 狀態。孢子在高相對濕度下，發芽屬於頂生單一成熟孢子型裡的 longitubus pattern (Braun & Cook 2012)，發芽管從孢子頂端 (terminal)、頂端側邊 (subterminal) 形成，發芽管長度多數較孢子寬度大，長度為孢子寬之 0.9–(2.8)–5.8

表 2. 本研究 *Pseudoidium neolycopersici* 分離株分離來源及形態特徵比較。

Table 2. Morphological characters of *Pseudoidium neolycopersici* isolates in this study.

		Conidia			Conidiophore		
Isolate	Host (cultivar)/sign position[z]	Length × width (μm) min.–(avg.)–max.	Length/ width ratio	Germ tube apex	Foot cell length × width (μm) min.–(avg.)–max.	Following cell	Characteristic
TARI PM-1	Cherry tomato (Jade Girl) / ad	29.0–(36.6)–47.2 × 15.2–(18.9)–22.9	1.5–(2.0)–3.1	Simple or lobed	30.5–(39.6)–53.3 × 7.6–(9.0)–10.6	2	Pseudoidium type[y]
TARI PM-2	Large tomato / ad	30.4–(38.8)–48.9 × 13.7–(18.6)–21.3	1.5–(2.1)–3.1	Simple or lobed	29.0–(43.5)–64.0 × 7.6–(8.0)–9.1	1–2	Pseudoidium type
TARI PM-5	Large tomato / ab	32.0–(43.1)–53.3 × 16.8–(20.1)–24.4	1.5–(2.2)–3.0	Simple or lobed	41.1–(49.0)–61.0 × 7.62–(7.8)–9.1	2	Pseudoidium type
TARI PM-7	Large tomato / ad	29.0–(39.2)–51.8 × 15.2–(19.3)–22.9	1.5–(2.0)–2.8	Simple or lobed	30.5–(45.1)–64.0 × 7.6–(8.4)–10.6	1–2	Pseudoidium type
P. neolycopersici (Braun & Cook 2012)	-[x]	(20–)25–45(–55) × (10–)12–20(–28)	1.7–2.8–(3.1)	Simple or lobed	(25–)30–60(–75) × (5–)6–10(–14)	1–2(–4)	Pseudoidium type

[z] Sign position means the side of leaves where pathogens were isolated from. ad = adaxial surface of leaves; ab = abdaxial surface of leaves.
[y] Pseudoidium type means producing conidia that mature singly.
[x] No description.

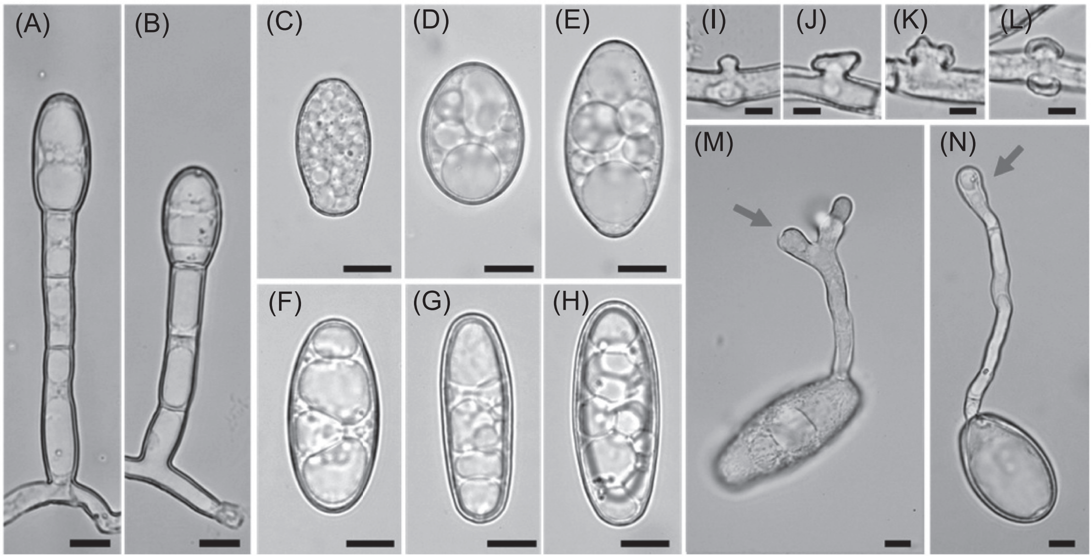

圖 3. *Pseudoidium neolycopersici* isolate TARI_PM-2 無性世代形態特徵。(A、B) 孢子單生於產孢梗上；(C) 孢子外形包括桶狀；(D–F) 卵形至橢圓形；(G、H) 圓柱狀；(I–K) 菌絲附著器單生；或 (L) 對生，包含 (I、L) 乳突狀到 (J、K) 裂瓣狀；(M) 發芽管由孢子近頂端或 (N) 頂端形成，發芽管末端為 (M) 叉狀或 (N) 無明顯分叉，(M、N，箭頭處) 附著器略膨大。比例尺為 10 µm。

Fig. 3. Morphological characters of anamoph structures of *Pseudoidium neolycopersici* isolate TARI_PM-2. (A, B) conidium forming singly from a conidiophore; (C) conidia shaped in doliiform; (D−F) ovoid−ellipsoid form; (G, H) cylindrical form; (I−K) hyphal appressoria solitary; or in (L) opposite pair, (I, L) nipple-shaped to (J, K) multilobed; (M) germ tube arising subterminally or (N) terminally with conidial appressoria enlarged and (M, N; indicated with an arrow) alobate. Bars = 10 µm.

倍，發芽管較長者，末端不形成明顯之附著器或僅略膨大，發芽管較短者末端有時呈不規則分叉狀，其孢子附著器形態多數略膨大 (圖 3M–N)。依據分離菌株之無性態形態，參考 Braun & Cook (2012) 之檢索表，將其鑑定為 *P. neolycopersici*。

取其中 3 供試菌株 rDNA ITS 序列與 21 株 *Erysiphe* 參考菌株 (reference strain) 之序列進行序列排比，包含 10 個親緣種，566 個鹼基對 (含 gaps)。親緣關係樹之演算方式使用 ML，並以 Kimura 2-parameter model (Kimura 1980) 為鹼基取代模型，並以 *Erysiphe glycines* F. L. Tai 作為外群 (out group)。結果顯示，3 分離株皆劃分在 *P. neolycopersici* 之支序群 (clade) 中 (拔靴法支撐數值為 87%)，此支序群跟 *E. macleayae* R. Y. Zheng & G. Q. Chen 與 *E. aquilegiae* DC. 此 2 菌種親緣關係相近但可區別 (圖 4)。

依病原菌感染位置、環境變化造成田間 3 種類型病徵

為釐清田間觀察到的病徵差異原因，測試不同接種條件下的病徵發展，以大果番茄金吉利品種為供試植物，TARI_PM-2 為供試菌株，接種點分別為葉正面與葉背，接種後皆放置於 24℃恆溫生長箱中。在感染後 10 d 時，葉正面接種之植株，接種表面能看到明顯白色粉狀病斑出現，而從葉背接種之植株於接種處可見明顯病兆，於病兆對應的正面也造成不明顯至明顯之褪綠或淺黃色暈斑。隨後，依各處理將半數接種植株持續放置於走入式生長箱，半數移置溫室 (23–35℃，平均 28℃)。

持續放置於恆溫生長箱的處理組別中，葉正面接種之植株病徵與田間觀察到的類型 1 病徵相似，病斑隨接種時間逐漸癒合成片狀，面積持續擴大，接種期間部分病斑造成葉肉黃化甚至出現壞疽，但對應處病兆明顯，病徵亦無

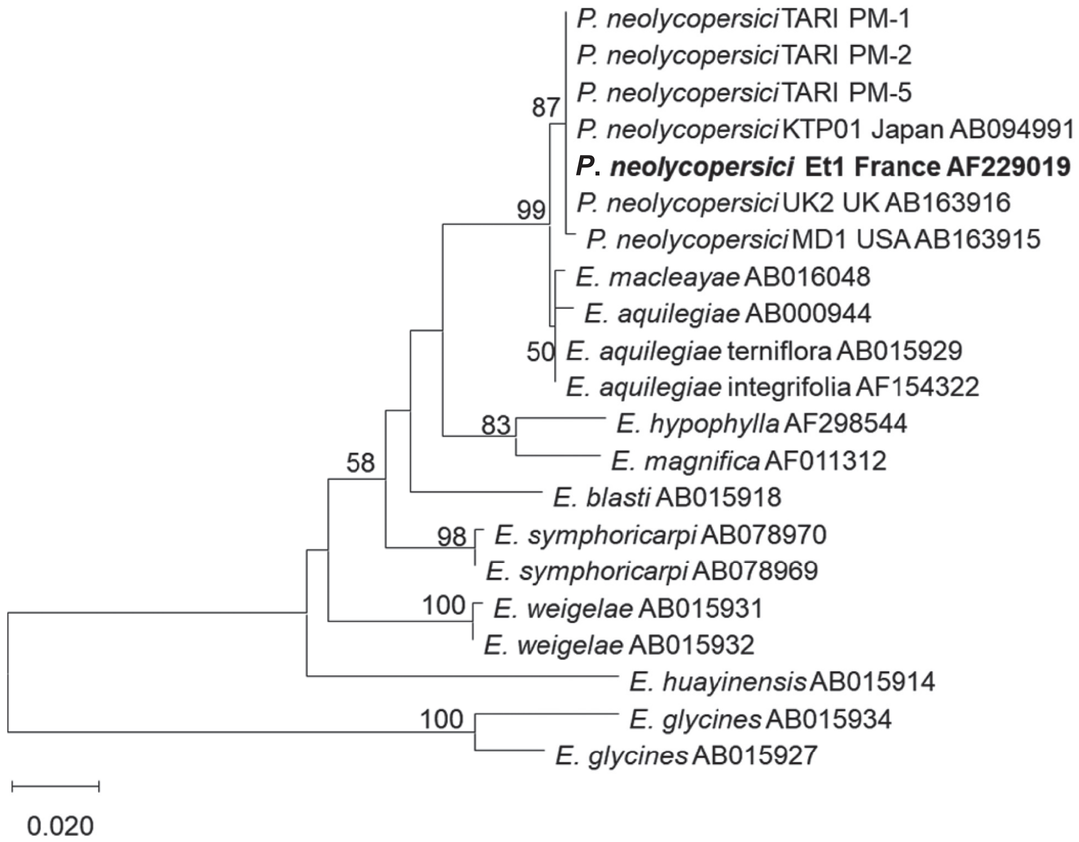

圖4. 白粉病菌 *Oidium* 屬之親緣關係樹。使用rDNA ITS序列以最大似然法建構，測試的菌株包含21株菌株，拔靴法檢測值 ≥ 50% 顯示於節點，以 *Erysiphe glycines* (AB015934, AB015927) 為外群，比例尺代表鹼基置換率為 0.020，標準菌株以粗黑體表示。

Fig. 4. A maximum likelihood phylogenetic tree of *Oidium* genus based on the nucleotide sequences of the rDNA internal transcribed spacer regions (ITS). Twenty one powdery mildew taxa were used. The tree was constructed with bootstrap support values (≥ 50% displayed at the nodes and *Erysiphe glycines* (AB015934, AB015927) as outgroup. The bar indicates 0.020 (2%) expected changes per site. Type strains *Pseudoidium neolycopersici* Et1 (AF229019) was indicated in bold.

受到限制跡象 (圖 5B)；而從葉背接種之植株病徵與類型 2 病徵相似，病兆對應的正面黃暈持續擴大且顏色加深，部分暈斑出現淺褐色壞疽 (圖 5C)。兩接種皆於 21 dpi 時造成感染部位萎凋，對照組則無任何病徵出現 (圖 5A)。根據接種結果，確認隨病原菌感染部位不同會造成不同病徵。

移至溫室的處理組別中，葉正面接種植株於移出的 4 d 後，即 14 dpi 時，病斑中心出現黃化和略為灰色之壞疽斑，於 19 dpi 時，葉面上病斑白色病兆減少，甚至肉眼難以辨別，且感染面積受限不再擴大，內部壞疽則轉為深褐色，甚而影響葉形，24 dpi 時除了原先感染部位病斑內側呈現深褐色壞疽，病斑外側則出現棕色壞疽且逐漸擴大 (圖 5E)；葉背接種植株於 14 dpi 時，病兆對應處之葉正面黃暈斑加深，於 19 dpi 時，黃暈病斑中心出現明顯深褐色壞疽，但病徵受限無明顯擴大，24 dpi 時除了原先壞疽病斑，病斑外則出現淺褐色壞疽且逐漸擴大 (圖 5F)。以上可知，無論葉背或葉面接種，供試植株在移入網室一段時間後皆產生與類型 3 相似的明顯壞疽，且病兆隨接種時間漸不明顯，而感染部位在出現壞疽後則明顯受限，但後期除了原先感染處之壞疽，病斑外

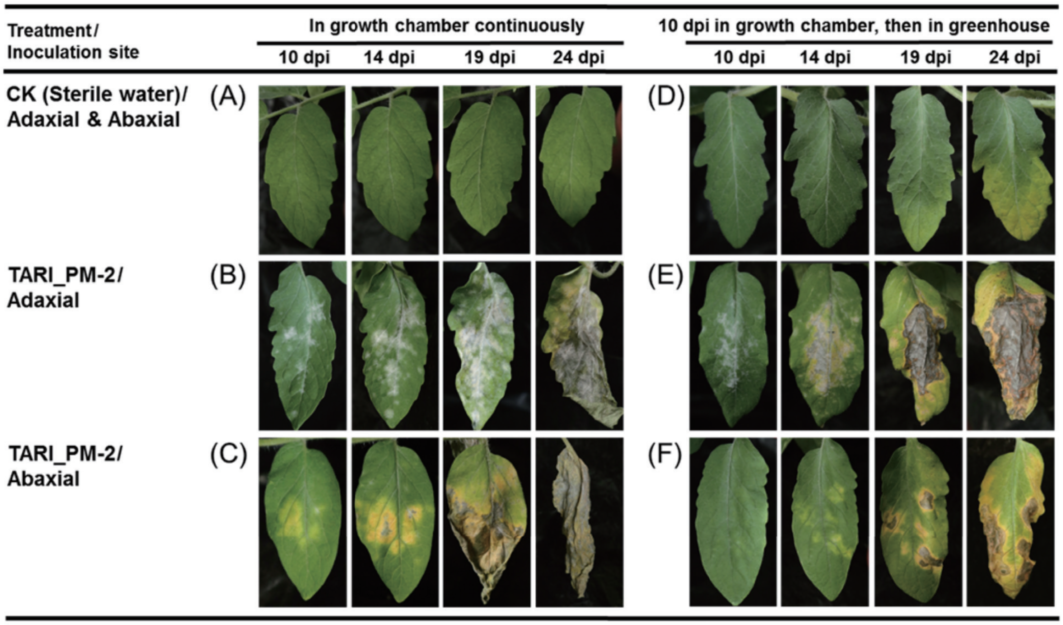

圖 5. 感病大果番茄 (「金吉利」品種) 白粉病菌於葉片正面 (葉面) 的病徵發展。植株接種後的 10 dpi 內皆放置在生長箱 (24℃)，接種白粉病菌 *Pseudoidium neolycopersici* isolate TARI_PM-2 分生孢子懸浮液方式分為接種於 (B、E) 葉面或 (C、F) 葉背，在 10 dpi 時將處理植株分為 (A–C) 走入式生長箱持續觀察組和 (D–F) 移置溫室環境 (23–35℃，平均 28℃) 觀察組。

Fig. 5. Symptom development of powdery mildew on upper side of leaves of susceptible tomato ('Golden Lucky' cultivar, large fruit type). The tested plants which were inocualted with conidia suspension of *Pseudoidium neolycopersici* isolate TARI_PM-2 on (B, E) the upper side or (C, F) lower side of leaves grew in the growth chamber (24℃) until 10 dpi. A half number of the tested plants kept growing in (A–C) the chamber and the rest tested plants were moved to (D–F) greenhouse (23–35℃, average 28℃) for observation. dpi: days post inoculation.

圍也出現淺棕色壞疽且逐漸擴大。接種期間對照組無病徵出現 (圖 5D)。比較走入式生長箱和網室接種結果，顯示類型 3 病徵的出現與感染期間環境變化相關。

小果番茄較大果番茄具有更高之耐病性

2019 年於霧峰的一網室進行田間調查時，觀察到無論大果的牛番茄還是小果品系的玉女番茄皆可自然感染白粉病，但病徵發展明顯不同。植株經採樣鏡檢確認病原菌皆為 *P. neolycopersici*，且無其他白粉病菌種複合感染。病徵觀察中發現，牛番茄與玉女番茄在感染後皆可能出現壞疽斑，惟前者多出現在病斑癒合後，且壞疽斑上多數產孢明顯；後者則出現在單斑形成時，且巨觀上無明顯產孢。2021 年於同一網室進行罹病度調查結果顯示，牛番茄為 80%，玉女番茄為 58% 且有顯著性差異，顯示玉女番茄較牛番茄對白粉病菌有較高的耐病性。

為瞭解不同番茄品種對於 *P. neolycopersici* 引起之白粉病的耐病性，本研究挑選台灣市面上 9 個商業品系番茄植株，以人工接種進行感病性差異試驗，過程中皆持續採樣鏡檢確認無其他白粉病菌種複合感染。試驗包含 4 個大果品系和 5 個小果品系，在 14 dpi 進行調查，小果類番茄除了「嬌女」品種外罹病度普遍低於大果類番茄，具有顯著差異，其中以「農友 301」罹病度 78 ± 2% 最高，「玉女」36 ± 2% 和「麗金」43 ± 3% 相對最低 (圖 6)。從病徵可觀察到，大果品系和小果品系的「嬌女」在病斑癒合後有時會出現壞疽斑，惟病斑上產孢明顯；小果番茄品系除了「嬌女」品種外在巨觀上白粉病感病面積或產孢量少，其中「玉女」、「麗金」品系有時可在葉表觀察到紫褐色小壞疽斑

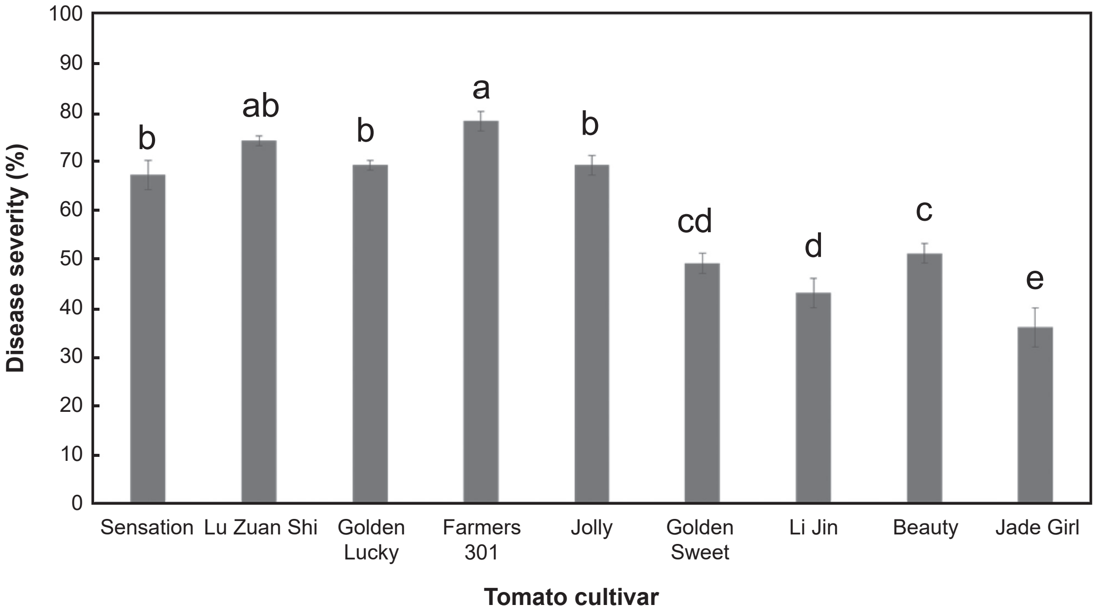

圖 6. 九個品種番茄對番茄白粉病菌 *Pseudoidium neolycopersici* 之感受性比較。於溫室環境中 (20–28℃，平均 24℃) 人工接種供試菌 (isolate TARI_PM-2) 14 d。縱軸單位為罹病度 (disease severity)。誤差線為平均值標準誤差 ($n = 4$)，以最小顯著差異性測驗在 5% 信心水準下 ($P < 0.05$) 比較處理間平均值之差異。

Fig. 6. Susceptibility of 9 tomato cultivars after being inoculated with conidia suspension (2×10^4 conidia mL^{-1}) of *Pseudoidium neolycopersici* (isolate TARI_PM-2) for 14 days in greenhouse (20–28℃, average 24℃). Error bar stands for standard error of mean ($n = 4$). Means with the same letter are not significantly different at 5% level by Fisher's protected least significant difference test.

或淺黃斑，白粉病病徵發展明顯受限。本試驗結果顯示，部分小果品種對 *P. neolycopersici* 引起的白粉病有較佳的耐病潛力 (圖 6)。

討論

本研究透過無性態形態特徵與 ITS 分子親緣演化分析結果，將番茄上分離之白粉病菌鑑定為 *P. neolycopersici*，並經由柯霍氏法則確認其病原性，此為 *P. neolycopersici* 在台灣番茄上首次詳細的紀錄報導。

在形態鑑定上，白粉病菌常以有性世代之形態特徵為依據，如子囊殼中的子囊數量或子囊殼上之附絲 (appendages) 數量等 (Zeller 1995)，而隨著部分菌株尚無觀察到有性世代，使用無性世代特徵作為鑑定的方法也臻於成熟 (Braun & Cook 2012)。雖然分生孢子或產孢梗的大小等部分形態在發育過程中會受到寄主和環境的影響，但 Whipps *et al*. (1998) 在透過大量樣本觀察 *P. neolycopersici* 於 13 科不同寄主上之形態，其指出在不同替代寄主間多數 *P. neolycopersici* 無性態特徵，如：孢子大小、產孢梗或足細胞間的測量值差異相當小，此在 Fletcher *et al*. (1988) 的研究中也有類似結果，顯見 *P. neolycopersici* 的無性世代形態穩定，可作為鑑定上的參考依據。與前人文獻紀錄進行比較，本研究代表菌株分生孢子整體略寬，其中 TARI_PM-2 產孢梗長度為 59–137 μm，略長於現有紀錄 30–130 μm，其他特徵皆符合前人描述且落於已記錄之形態大小範圍內，顯示本研究 4 株代表菌株透過形態可鑑定為 *P. neolycopersici*。

台灣已記錄可引起番茄白粉病之菌種有 4 種 (Tzean *et al*. 2019; Lin *et al*. 2022)，在已記錄的菌種中，病原菌的感染方式、分生孢子和產孢梗形成方法等都能作為與 *P. neolycopersici* 區別之特徵。以感染方式而言，僅有 *L. taurica* 主要透過葉背氣孔侵入和產孢，以內生形態進

行危害，此外 *L. taurica* 具有批針狀和圓柱狀雙形態分生孢子與多數白粉病菌有所不同。而在分生孢子和產孢梗形成上，*G. orontii* (syn. *E. orontii*) 與 *G. cichoracearum* (syn. *E. cichoracearum*) 兩者產孢方式屬於串生成熟型 (euoidium type)，即多個分生孢子在產孢梗上鏈生 (catenescent) 而逐漸成熟，與之相對 *P. neolycopersici* 則屬於頂生單一孢子成熟型，為單一孢子於產孢梗上成熟 (Whipps *et al*. 1998; Braun & Cook 2012)，形態上即明顯不同。

值得一提的是，縱然藉由上述感染方式或形態差異即能簡單將 *P. neolycopersici* 與台灣已記錄種進行區別，但在 Kiss *et al*. (2001) 研究中曾提到 *P. neolycopersici* 有時會形成 2–6 個分生孢子相連之假鏈生 (pseudo-chains) 特徵，在本研究蒐集的田間或葉圓片樣本上以解剖顯微鏡直接觀察時也同樣能發現到 *P. neolycopersici* 菌株出現此現象，此與 *Golovinomyces* 屬產生的鏈生孢子兩者間必須避免鑑定上的混淆。針對此特性 Oichi *et al*. (2006) 透過試驗闡明 *P. neolycopersici* 分生孢子相連於產孢梗的情形並非串生成熟型 (euoidium type) 產孢形態，更證實此特徵的形成是導因於低風速的環境，與濕度無關。此外，危害病徵上 *P. neolycopersici* 自然感染造成的類型 2 黃化病徵雖然與多數白粉病菌不同，但卻與 *L. taurica* 造成的病徵相似，在葉正面造成不規則或受葉脈限制的黃化、褪綠病徵，兩者在病徵上不易判別，需再觀察病原菌形態才能加以區分。

除了形態和病徵特徵，分子鑑定亦能將 *P. neolycopersici* 和目前番茄上已知的菌種進行區分，如 *G. orontii* 與 *G. cichoracearum* (Jones *et al*. 2000)，或目前僅在澳洲和美國加利福尼亞州發現卻曾造成與 *P. neolycopersici* 鑑定上混淆的 *Oidium lycopersici* (Kiss *et al*. 2001; Salvucci *et al*. 2016)。本研究亦利用 rDNA ITS 序列區間進行親緣關係樹的繪製，可見 3 代表菌株與其他國家分離之 *P. neolycopersici* 菌株落在相同支序群中，且與多數前人研究結果一致可與 *E. aquilegiae* 和 *E. macleayae* 兩關係相近之親緣種分開 (Jones *et al*. 2000; Kashimoto *et al*. 2003a; Kiss *et al*. 2005)。

本研究在接種試驗中透過不同植株部位的接種和植株生長環境的改變，重現與田間觀察到 3 種類型病徵相似的病斑，除了證實此 3 類型病徵皆由 *P. neolycopersici* 單獨感染形成外，也證實此 3 種病徵的形成原因與病原菌感染部位和發病環境相關。病徵類型 1 與 2 病徵差異原因為病原菌感染不同葉部部位所造成，而病徵類型 3 對照於前述 2 者則是出現在罹病組織處於相對溫度、濕度變化較高的環境，顯示環境中因子可成為病徵形成的影響條件之一。在 Prokopová *et al*. (2010) 研究中即曾以高溫 (40.5℃) 前處理感病性植株以誘導熱休克相關之抗病反應，且在後續接種白粉病菌後發現植株的壞疽斑形成明顯增加，對應於本研究在接種病原菌後進行的環境改變條件中包含溫度的升高，且田間觀察中此病徵僅在白粉病好發季節相對較溫暖的 5 月發現，推測壞疽斑的出現與高溫有所關聯，但白粉病的病勢發展也受寄主基因型、環境中的光線強度、濕度等因子交互影響 (Kashimoto *et al*. 2003a; Jacob *et al*. 2008)，因此引起病徵類型 3 的主要成因尚需要更多研究進行探討和驗證。

由於番茄為重要的經濟作物，加上 *P. neolycopersici* 曾嚴重危害番茄並於世界各地廣泛傳播，防治上除了化學藥劑的使用外，學者亦曾針對市面上的商業栽培品種進行抗病篩選，如日本、歐洲…等地都有相關的試驗報導，惟測試的品種中幾乎多屬於感病品種。目前已知對 *P. neolycopersici* 白粉病菌具抗病性的植株多為野生茄科或學者將其進行雜交育種的後代，巨觀上的抗病反應包含了在白粉病菌感染時可能使菌絲生長明顯受限、產孢量減少或不產孢 (Lindhout *et al*. 1993) 又或者在入侵過程吸器形成前後產生過敏性反應阻止病原菌擴展等 (Mieslerová *et al*. 2004; Matsuda *et al*. 2005)。

本研究於 2019 年 12 月在霧峰區玉女番茄與牛番茄混植的網室中觀察到 2 品種番茄在自然感染 *P. neolycopersici* 白粉病菌時呈現不同感病性，相對於牛番茄，玉女番茄感染白粉病菌時病徵多呈現產孢少之淺黃斑且同時有疑似過敏性反應的壞疽斑出現，此與野生種番茄出

現抗病反應的病徵描述相似，於 2021 年 1 月同一地點再度調查確認兩者間的罹病度有顯著差異，推測在自然感染情況下，玉女番茄具有一定程度的耐病性。

根據此田間觀察結果，進一步推測番茄大小果間或許存在感病性差異，為確認此可能性，本研究遂挑選目前台灣商業育種之 4 個大果類品種和 5 個小果類品種，共 9 個番茄品種進行對 *P. neolycopersici* 白粉病菌之感病性差異測試。試驗結果與國外多數研究相仿 (Fletcher 1988; Matsuda *et al*. 2001; Toyoda 2008; Arushi & Banyal 2018)，此 9 個番茄品種對 *P. neolycopersici* 皆未具有完全的抗病性 (圖 6)，但可發現多數小果品種在巨觀下葉表普遍白粉病菌的感病面積較小或產孢量較少，相較大果品系確實有較高的耐病性，此一發現顯示台灣商業品種中小果番茄在抗病育種上存在較高潛力。值得一提的是，在歐洲曾被報導具有抗性之商業品種 ‘Grace’ (Kashimoto *et al*. 2003b) 屬於大果品種，顯示相關之抗病機制或基因並不僅局限於小果番茄之中。另外本研究曾於同一溫室但較冷涼下 (18–23℃，平均 20℃) 進行接種試驗時，發現無論大、小果番茄罹病度普遍高於 70%，大小果間罹病度差異不明顯 (數據未呈現)。顯示小果番茄僅是耐病性較高，在適合 *P. neolycopersici* 的發病環境下仍會發病且嚴重。關於本研究番茄植株進行白粉病菌人工接種時僅在發生初期方具有耐病性的原因尚不明確，但 Whipps *et al*. (1998) 認為部分植株在強勢接種大量孢子的情況下會產生與田間實際不相同之病徵，其亦觀察到產生壞疽的病斑上有大量產孢的情況，本研究在進行試驗時除了人工接種源亦包含了田間自然感染源，在人工接種濃度固定下，是否因試驗期間環境逐漸利於白粉病發生 (田間初始感染源上升) 而造成整體接種源過高，又或是田間自然感染源存在不同品系，造成植株巨觀上出現抗感病性差異，此間差異需要再探討。

本研究為台灣首次對番茄上發生之 *P. neolycopersici* 進行完整接種、形態鑑定和親緣演化分析的報導，透過不同接種部位和環境條件證實了 3 種病徵的發生，此有利於辨識 *P. neolycopersici* 在田間番茄上造成的危害。而依據田間自然感染的罹病度調查和人工接種大、小果抗感病性試驗中也發現所挑選之台灣商業品種中部分小果番茄對於 *P. neolycopersici* 白粉病菌的耐病性較佳，故用於抗病育種上有較高的潛力。另外，本研究中並無針對台灣分離株的品系或病原小種 (pathotype) 進行深入探討，依據國外紀錄顯示此病原菌寄主範圍廣泛，但台灣目前僅有木瓜上有相關之危害報導 (Tsay *et al*. 2011)，針對台灣田間發生之 *P. neolycopersici* 是否存在不同毒力或生理小種之菌株則有待未來進一步探討。

誌謝

本研究承蒙行政院科技部補助專題研究計畫 MOST 107-2321-B-002-061、MOST 108-2321-B-002-025 及 MOST 109-2321-B-002-051 經費支持，內文數據分析有幸得行政院農業委員會農業試驗所 (簡稱農試所) 呂椿棠博士指教，並仰賴農試所王如玉小姐協助調查、烏日幸福 a 味農園園主吳松杰先生長期提供地點進行病害採集與觀察，特此致謝。

引用文獻

Arushi, A. B. and D. K. Banyal. 2018. Evaluation of IDM components for management of tomato powdery mildew under protected cultivation. Intl. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 7:21–31. doi:10.20546/ijcmas.2018.707.003

Braun, U. and R. T. A. Cook. 2012. Taxonomic Manual of the *Erysiphales* (Powdery Mildews). CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. Utrecht, The Netherlands. 707 pp.

Chelal, J. and B. Hau. 2015. Temporal dynamics of powdery mildew (*Oidium neolycopersici*) and its effects on the host growth dynamics of tomato. J. Plant Pathol. 163:711–722. doi:10.1111/jph.12368

Cunnington, J. H., S. Takamatsu, A. C. Lawrie, and I. G. Pascoe. 2003. Molecular identification of anamorphic powdery mildews (*Erysiphales*). Australas. Plant Pathol. 32:421–428. doi:10.1071/AP03045

Fletcher, J. T., B. J. Smewin, and R. T. A. Cook. 1988. Tomato powdery mildew. Plant Pathol. 37:594–598. doi:10.1111/j.1365-3059.1988.tb02121.x

Hall, T. A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological

sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41:95–98. doi:10.14601/PHYTOPATHOL_MEDITERR-14998U1.29

Hsieh, T. F., J. H. Huang, and L. J. Hsieh. 2005. Control of powdery mildew with potassium bicarbonate and polyelectrolyte. Plant Pathol. Bull. 14:125–132. doi:10.6649/PPB.200506_14(2).0005 (in Chinese with English abstract)

Huang, J. H., C. W. Chen, and J. F. Su. 2009. Propagation, inoculation and preservation of *Podosphaera xanthii* caused muskmelon powdery mildew. J. Taiwan Agric. Res. 58:176–184. doi:10.6156/JTAR/2009.05803.03 (in Chinese with English abstract)

Jacob, D., D. R. David, A. Sztjenberg, and Y. Elad. 2008. Conditions for development of powdery mildew of tomato caused by *Oidium neolycopersici*. Phytopathology. 98:270–281. doi:10.1094/PHYTO-98-3-0270

Jones, H. E., J. M. Whipps, B. J. Thomas, T. L. Carver, and S. J. Gurr. 2000. Initial events in the colonisation of tomatoes by *Oidium lycopersici*, a distinct powdery mildew fungus of *Lycopersicon* species. Can. J. Bot. 78:1361–1366. doi:10.1139/b00-108

Jones, H., J. M. Whipps, and S. J. Gurr. 2001. The tomato powdery mildew fungus *Oidium neolycopersici*. Mol. Plant Pathol. 2:303–309. doi:10.1046/j.1464-6722.2001.00084.x

Kashimoto, K., Y. Matsuda, K. Matsutani, T. Sameshima, K. Kakutani, T. Nonomura, and H. Toyoda. 2003a. Morphological and molecular characterization for a Japanese isolate of tomato powdery mildew *Oidium neolycopersici* and its host range. J. Gen. Plant Pathol. 69:176–185. doi:10.1007/s10327-002-0034-7

Kashimoto, K., T. Sameshima, Y. Matsuda, Y. Matsuda, T. Nonomura, W. Oichi, K. Kakutani, K. Kakutani, K. Nakata, S. I. Kusakari, and H. Toyoda. 2003b. Infectivity of a Japanese isolate of *Oidium neolycopersici* KTP-01 to a European tomato cultivar resistant to *O. lycopersici*. J. Gen. Plant Pathol. 69:406–408. doi:10.1007/s10327-003-0070-y

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16:111–120. doi:10.1007/BF01731581

Kiss, L., R. T. Cook, G. S. Saenz, J. H. Cunnington, S. Takamatsu, I. Pascoe, M. Bardin, P. C. Nicot, Y. Sato, and A. Y. Rossman. 2001. Identification of two powdery mildew fungi, *Oidium neolycopersici* sp. nov. and *O. lycopersici*, infecting tomato in different parts of the world. Mycol. Res. 105:684–697. doi:10.1017/S0953756201004105

Kiss, L., S. Takamatsu, and J. H. Cunnington. 2005. Molecular identification of *Oidium neolycopersici* as the causal agent of the recent tomato powdery mildew epidemics in North America. Plant Dis. 89:491–496. doi:10.1094/PD-89-0491

Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol. Biol. Evol. 35:1547–1549. doi:10.1093/molbev/msy096

Lebeda, A., B. Mieslerová, M. Petřivalský, L. Luhová, M. Špundová, M. Sedlářová, V. Nožková-Hlaváčková, and D. A. C. Pink. 2014. Resistance mechanisms of wild tomato germplasm to infection of *Oidium neolycopersici*. Eur. J. Plant Pathol. 138:569–596. doi:10.1007/s10658-013-0307-3

Lebeda, A., B. Mieslerová, T. Jankovics, L. Kiss, and E. J. Van der Linde. 2015. First detection of tomato powdery mildew caused by *Oidium neolycopersici* in South Africa. S. Afr. J. Bot. 99:153–157. doi:10.1016/j.sajb.2015.03.196

Lin, C. P., Y. L. Dai, J. H. Huang, and J. N. Tsai. 2022. First report of tomato powdery mildew caused by *Leveillula taurica* in Taiwan. Plant Dis. 106:757 doi:10.1094/PDIS-02-21-0366-PDN

Lindhout, P., G. Pet, and H. van der Beek. 1993. Screening wild *Lycopersicon* species for resistance to powdery mildew (*Oidium lycoperiscum*). Euphytica. 72:43–49. doi:10.1007/BF00023771

Matsuda, Y., K. Kashimoto, Y. Takikawa, R. Aikami, T. Nonomura, and H. Toyoda. 2001. Occurrence of new powdery mildew on greenhouse tomato cultivars. J. Gen. Plant Pathol. 67:294–298. doi:10.1007/PL00013034

Matsuda, Y., Y. Mori, Y. Sakano, M. Nishida, K. Tarumoto, T. Nonomura, H. Nonomura, H. Nishimura, S. I. Kusakari, and H. Toyoda. 2005. Screening of wild Lycopersicon species for resistance to Japanese isolate of tomato powdery mildew Oidium neolycopersici. Breed. Sci. 55:355–360. doi:10.1270/jsbbs.55.355

Mieslerová, B., A. Lebeda, and R. Kennedy. 2004. Variation in *Oidium neolycopersici* development on host and non-host plant species and their tissue defence responses. Ann. Appl. Biol. 144:237–248. doi:10.1111/j.1744-7348.2004.tb00339.x

Oichi, W., Y. Matsuda, T. Nonomura, H. Toyoda, L. Xu, and S. Kusakari. 2006. Formation of conidial pseudochains by tomato powdery mildew *Oidium neolycopersici*. Plant Dis. 90:915–919. doi:10.1094/PD-90-0915

Park, M. J., H. J. Jee, J. H. Kim, and H. D. Shin. 2010. First confirmed report of tomato powdery mil-

dew caused by *Oidium neolycopersici* in Korea. Plant Pathol. 59:409. doi:10.1111/j.1365-3059.2009.02196.x

Prokopová, J., B. Mieslerová, V. Hlaváčková, J. Hlavinka, A. Lebeda, J. Nauš, and M. Špundová. 2010. Changes in photosynthesis of *Lycopersicon* spp. plants induced by tomato powdery mildew infection in combination with heat shock pre-treatment. Physiol. Mol. Plant Pathol. 74:205–213. doi:10.1016/j.pmpp.2010.01.001

Ridout, C. J. 2009. Profiles in pathogenesis and mutualism: Powdery mildews. p.51–68. *in*: Plant Relationships. (Deising, H. B., ed.) Springer. Berlin, Germany. 398 pp. doi:10.1007/978-3-540-87407-2_3

Salvucci, A., B. J. Aegerter, E. M. Miyao, and I. Stergiopoulos. 2016. First report of powdery mildew caused by *Oidium lycopersici* in field-grown tomatoes in California. Plant Dis. 100:1497. doi:10.1094/PDIS-11-15-1362-PDN

Stevanović, M., I. Stanković, A. Vučurović, N. Dolovac, E. Pfaf-Dolovac, B. Krstić, and A. Bulajić. 2012. First report of *Oidium neolycopersici* on greenhouse tomatoes in Serbia. Plant Dis. 96:912. doi:10.1094/PDIS-02-12-0179-PDN

Toyoda, H. 2008. An inoculation assay of tomato plants for screening resistance to *Oidium neolycopersici*: Tabulation of host responses and fungal growth on the laboratory list of common and wild *Lycopersicon* species. Mem. Fac. Agr. Kinki Univ. 41:177–188.

Tsay, J. G., R. S. Chen, H. L. Wang, W. L. Wang, and B. C. Weng. 2011. First report of powdery mildew caused by *Erysiphe diffusa*, *Oidium neolycopersici*, and *Podosphaera xanthii* on papaya in Taiwan. Plant Dis. 95:1188. doi:10.1094/PDIS-05-11-0362

Tzean, S. S., K. C. Tzeng, C. A. Chang, T. T. Tsay, and S. F. Yen. 2019. List of Plant Diseases in Taiwan. 5th ed. Taiwan Phytopathological Society. Taichung, Taiwan. 329 pp. (in Chinese)

Whipps, J. M., S. P. Budge, and J. S. Fenlon. 1998. Characteristics and host range of tomato powdery mildew. Plant Pathol. 47:36–48. doi:10.1046/j.1365-3059.1998.00207.x

Zeller, K. A. 1995. Phylogenetic relatedness within the genus *Erysiphe estimated* with morphological characteristics. Mycologia. 87:525–531. doi:10.1080/00275514.1995.12026564

New Powdery Mildew of Tomato Caused by *Pseudoidium neolycopersici* and Susceptibility of Commercial Cultivars to the Disease in Taiwan

Yu-Lun Dai[1], Jin-Hsing Huang[2], Jyh-Nong Tsai[3], and Chu-Ping Lin[4,*]

Abstract

Dai, Y. L, J. H. Huang, J. N. Tsai, and C. P. Lin. 2022. New powdery mildew of tomato caused by *Pseudoidium neolycopersici* and susceptibility of commercial cultivars to the disease in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 71(1):19–34.

Three types of powdery mildew symptoms were observed on tomatoes. Type 1 symptoms displayed typical white-powdery spots with numerous spores on the upper surface of leaves. Type 2 symptoms were irregular yellowish-halo lesions on the upper surface of leaves with a few spores on the lower surface of leaves. Type 3 symptom showed circular to irregular brown lesions with a few spores on the upper surface of leaves. Conidiospores but not ascospores were microscopically observed on leaves with these types of symptoms, and several single-spore from these infected leaves were individually isolated and then cultured on tomato leaf discs for pathogen identification and pathogenicity tests. Based on morphological characteristics and phylogenetic analysis of internal transcribed spacer (ITS), the fungus was identified as *Pseudoidium neolycopersici*. Pathogenicity tests showed that Type 1 symptoms occurred when the inoculum was sprayed on the upper side of leaves. Type 2 symptoms occurred when the inoculum was applied on lower side of leaves. Type 3 symptoms occurred when the temperature and humidity fluctuated severely. Furthermore, *P. neolycopersici* caused severe leaf symptoms and produced abundant spores on large fruit tomato cultivars 'Lu Zuan Shi', 'Golden Lucky', 'Farmers 301' and 'Sensation', and caused mild symptoms and reduced sporulation on cherry tomato cultivars 'Beauty', 'Jade Girl', 'Li Jin' and 'Golden Sweet'. *P. neolycopersici* caused severe symptoms on cv. 'Jolly'. This study is the first report confirming the pathogenicity of *P. neolycopersici* on tomato in Taiwan and describing the variable symptoms of the disease.

Key words: Powdery mildew, Identification, Symptoms, *Pseudoidium neolycopersici*.

Received: August 18, 2021; Accepted: October 12, 2021.

[*] Corresponding author, e-mail: cplin@tari.gov.tw
[1] Project Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[2] Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[3] Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[4] Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 71(1):35–47 (2022)
DOI:10.6156/JTAR.202203_71(1).0004 研究報告

小花蕙蘭細斑病菌 *Fusarium proliferatum* 之生長與寄主侵染特性

黃巧雯[1,*] 黃晉興[2] 謝廷芳[3]

摘要

黃巧雯、黃晉興、謝廷芳。2022。小花蕙蘭細斑病菌 *Fusarium proliferatum* 之生長與寄主侵染特性。台灣農業研究 71(1):35–47。

細斑病 (fleck spot) 為小花蕙蘭栽培過程中重要葉部病害之一，主要危害幼葉，在幼葉上產生細小黑褐色圓形或不規則形病斑，有時病斑周圍產生淡黃色暈環，雖然葉片被病原菌感染後其病斑不會繼續擴大，但葉片具有斑點不美觀而影響植株的商品價值，偶而會造成葉片基部腐敗而死亡。由病組織所分離到真菌，依據形態特徵及核醣體內轉錄區間與 translation elongation factor 1 alpha (*TEF-1α*) 基因的核酸序列比對鑑定為 *Fusarium proliferatum*，並完成柯霍氏法則證明本菌對小花蕙蘭具有病原性。本病原菌最適菌絲生長與孢子發芽溫度分別為 24–28℃與 20–32℃。小花蕙蘭葉細斑病菌分離株 (*F. proliferatum* Fp-172) 可在四季蘭、報歲蘭及春蘭等品種嫩葉上造成細小褐色斑點，但在成熟葉片上則不造成病斑。另將此菌株的孢子懸浮液 (10^6 spores mL^{-1}) 噴施接種於四季蘭不同齡期幼芽葉片上，經 28 d 後，苗齡 0.5、1.0、1.5、2.5、3.5 及 4.5 mo 的幼芽罹病度分別為 58.3–59.3%、52.8–62.5%、29.2–49.3%、13.9–25.9%、2.8–14.6% 及 0%，成熟葉片則無病斑產生。由細斑病菌易於感染 1.5 mo 內齡期幼芽的結果，可作為未來擬定葉細斑病防治時程之參考依據。

關鍵詞：小花蕙蘭、細斑病、細斑病菌。

前言

小花蕙蘭俗稱國蘭 (Chinese cymbidium)，是由蕙蘭屬 (Genus *Cymbidium*) 的四季蘭 (或稱建蘭) (*C. ensifolium*)、報歲蘭 (*C. sinense*)、春蘭 (*C. goeringii*)、寒蘭 (*C. kanran*) 及九華蘭 (*C. faberi*) 等植物所組合成複合族群的統稱，其原生地分布在中國、台灣、韓國及日本等地區，又稱東洋蘭；這類植株株型、花型較小，與大花型的虎頭蘭或稱大花蕙蘭具區別性，又稱為小花蕙蘭 (oriental cymbidium)，其繁殖各自以組培苗及分株為主 (Hung *et al*. 2017)。台灣小花蕙蘭多以外銷為主，70–80% 以上銷往韓國，其他國家如日本、香港及北美都有零星出口，近年來中國逐漸成為另一個重要市場。目前台灣小花蕙蘭栽種面積約 70–100 ha，栽種地區以台中、南投、雲林、嘉義、高雄及屏東等中南部為主，多數以雙層遮陰網室栽培，其中栽培品種依序為四季蘭 (53%)、報歲蘭 (36%)、春蘭 (6%) 及其他小花蕙蘭 (5%) 等 (Hung *et al*. 2010; Lin 2015)。

小花蕙蘭為地生蘭，主要由葉片 (leaf)、假球莖 (pseudobulb)、鞘葉 (sheath leaf) 及肥大的根 (root) 組成，慣行栽培以分芽繁殖為主 (Du Puy & Cribb 2007; Hsu 2010)。小花蕙蘭生育緩慢且幼年性長，假球莖的側芽長出新芽，發育成叢生狀的植株。由田間觀察發現，嫩葉外觀上淺綠色、葉質柔軟又光滑細緻，逐

投稿日期：2021 年 8 月 11 日；接受日期：2021 年 10 月 15 日。
[*] 通訊作者：cwhuang@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所植物病理組研究員兼組長。台灣 台中市。

漸長大成成熟葉時其外觀上轉深綠色、葉質硬厚且葉面較粗糙。四季蘭從新芽萌發至發育成熟約 5–6 mo；報歲蘭新芽萌發至成熟需約 8 mo (Hung *et al*. 2010)。於栽培農友術語中小花蕙蘭之不同齡期芽 (shoot age)，以植株成熟葉片 (10 分) 之相對應長度比例區分為幾分芽幼葉齡期，此時期與本研究觀察四季蘭剛冒新芽時期約為新芽生長 2 wk 時間；當新芽生長 1 mo 時間相對於 1–2 分芽幼葉齡期；新芽生長到 1.5 mo 時間相對於 2–3 分芽；當新芽生長長度到成熟植株一半時為 5 分芽，需 2.5 mo 時間；當新芽生長到 8 分芽時需 3.5 mo 時間；當新芽生長成成熟葉時則需要 4–5 mo 時間。四季蘭一年可完成 1–2 個生長週期。

台灣迄今正式記載之小花蕙蘭主要病害有由 *Cymbidium mosaic virus* (CyMV) 引起的蕙蘭嵌紋病、由 *Odontoglossum rigspot virus* (ORSV) 引起的齒舌蘭輪斑病；由 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 引起的細菌性軟腐病、由 *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* 引起的細菌性褐斑病；由 *Phytophthora palmivora*、*P. parasitica* 引起的疫病、由 *Botrytis cinerea* 引起的灰黴病、由 *Colletotrichum gloeosporioides* 引起的炭疽病、由 *Phyllosticta cymbidii* 引起的葉斑病、由 *Fusarium oxysporum* 引起的基腐病或假球莖腐敗病及由 *F. proliferatum* 引起的小花蕙蘭葉細斑病；另外亦有葉芽線蟲 (*Aphelenchoides besseyi*, *A. bicaudatus*)、根瘤線蟲 (*Meloidogyne incognita*)、南方根腐線蟲 (*Pratylenchus coffeae*) 引起的線蟲病害 (Hsu *et al*. 2002; Chen *et al*. 2015; Wang *et al*. 2018; Huang *et al*. 2020)。其中由 *F. proliferatum* 引起的葉細斑病 (fleck spot, leaf spot)，在台灣不僅危害蕙蘭、文心蘭、石斛蘭及嘉德麗雅蘭，亦為百合苗枯病 (Wu & Huang 1997) 及孤挺花赤斑病 (Su *et al*. 2011) 主要病原菌；而國外則會造成圓錐石頭花冠腐病 (crown rot of gypsophila) (Lee *et al*. 2011)、紫苜蓿根腐病 (root rot of alfalfa) (Cong *et al*. 2016)、萱草花腐病 (flower rot of daylily) (Li *et al*. 2018) 及糖松根腐病 (Fusarium root of sugar pine) (Stewart *et al*. 2016) 等。

本病主要危害初生芽之葉片，初期在葉背上產生細小黑褐色圓形或不規則形病斑，有時病斑周圍產生淡黃色暈環，不久後病斑逐漸呈現褐化壞疽，病斑不再繼續擴大，有時嚴重時導致幼芽褐化枯萎死亡，而小花蕙蘭是以芽計價，若新芽、幼葉無法健康生長，則嚴重影響植株的商品價值。目前雖已知 *F. proliferatum* 為引起小花蕙蘭葉細斑病之主要病原菌，然其在田間之發生生態仍未明，另外，觀察園區葉細斑病發生情形，發現病徵容易出現在幼芽葉片上，隨著幼芽越成熟其病徵越不易表現，為釐清小花蕙蘭葉細斑病病原特性與發生生態，本研究進行病原菌形態觀察、生理特性及病原性分析外，另探討 *F. proliferatum* 感染小花蕙蘭之不同齡期葉片之難易度，作為未來防治葉細斑病之參考依據。

材料與方法

病原菌分離與保存

將田間罹患細斑病病徵之罹病葉片攜回實驗室，直接切取罹病葉片，以 0.5% (w/v) 次氯酸鈉漂洗消毒 30 s，繼而以 75% (v/v) 酒精消毒 30 s，最後再以無菌水漂洗 2 次，自然風乾後，利用滅菌過之解剖刀切取病健部相鄰組織置於 2% (w/v) 水瓊脂培養基 (water agar; WA) 上分離，將培養基置於室溫 4–5 d，其分離所得之菌株置於 potato dextrose agar (PDA; Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) 中純化後，待其產孢後進行單孢分離，並將其保存於 PDA 斜面培養基及無菌水保存管中，並置於 10℃ 保存備用。本研究使用之 Fp-165 及 Fp-172 菌株為分別由南投縣魚池鄉及雲林縣莿桐鄉小花蕙蘭罹病葉片上所分離之菌株。

接種源配製

將由小花蕙蘭葉細斑病組織分離之 *F. proliferatum* Fp-172 分離株培養於 PDA 斜面，置於 25℃黑暗培養約 7 d 後，以無菌水將 PDA 上所產生之孢子洗下，並利用血球計數器 (hemacytometer, Bright-Line, Pomona, CA, USA) 計算孢子濃度，再以無菌水製成孢子懸浮液 (10^6 spores mL^{-1}) 供接種試驗用。

病原菌形態觀察與分子鑑定

將所純化之病原菌菌株 Fp-165 與 Fp-172 培養於 PDA 培養基上，置於 24℃黑暗培養約 7 d 後觀察菌落形態；後再將本病原菌置於 PDA 持續培養約 7 d 待其產孢，以滅菌之針頭挑取培養基上產孢之分生孢子，置於載玻片上，以光學顯微鏡 (Leica DM2500, Leica, Wetzlar, Germany) 觀察孢子形態與分生孢子梗構造，並以 NIS-Elements 4.51 版軟體 (Nikon, Tokyo, Japan) 測量 50 個以上分生孢子大小。再參考 Summerell *et al*. (2001) 及 Leslie *et al*. (2006) 所描述的鐮孢菌孢子著生方式與形態，鑑定所分離之鐮孢菌菌株。分子鑑定方式則是刮取菌絲置於微量離心管中，加入 0.5 N NaOH 溶液，將菌絲磨碎後，以 28,500× *g* 離心 (Heraeus Fresco 21 Microcentrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 5 min 並吸取上清液，與 9 倍體積之 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) 混合，直接吸取混合後之溶液，以 Taq DNA Poly (Protech, Taipei, Taiwan) 聚合酶酵素進行 DNA 聚合酶鏈鎖反應，分別增幅 internal transcribed spacer (ITS) (White *et al*. 1989) 與 translation elongation factor 1 alpha (*TEF-1α*) 基因片段 (O'Donnell *et al*.1998; Geiser *et al*. 2004)，增幅後產物委由源資國際生物科技股份有限公司 (Tri-I Biotech Inc., New Taipei, Taiwan) 進行定序，定序後之序列再於 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 網站上所登錄之資料庫進行菌株序列分析比對，並將該序列登錄於 NCBI 基因資料庫。

小花蕙蘭葉細斑病菌之病原性測定

購買市售小花蕙蘭之報歲蘭、「富山」四季蘭、「彩虹」四季蘭及「鐵骨素心」四季蘭等品種植株。將 *F. proliferatum* Fp-172 菌株濃度為 10^6 spores mL^{-1} 孢子懸浮液以噴霧瓶均勻噴霧於小花蕙蘭新芽部位 (約 1 mo 內，1–2 分芽)，每株約 2 mL，隨即以塑膠袋套袋進行保濕 (一直保濕到試驗結束)，並置於 28℃定溫箱中，持續觀察葉片上病徵進展及植株是否有基部褐化、植株枯死之情形。發病後，再由罹病組織依上述組織分離法分離病原菌，以完成柯霍氏法則 (Koch's postulates)。

溫度對病原菌菌絲生長與孢子發芽之影響

將 *F. proliferatum* Fp-165 及 Fp-172 菌株分別於 PDA 培養基室溫培養 7 d 後，以直徑 0.5 cm 滅菌過之打孔器切取菌絲邊緣，置於 PDA 平板中央，分別置於 4℃、8℃、12℃、16℃、20℃、24℃、28℃、32℃、36℃及 40℃之定溫箱中黑暗培養，於培養後第 8 天測量其菌絲生長之直徑，每個處理 4 重複，本試驗重複進行 2 次。另外，*F. proliferatum* 之 Fp-165 及 Fp-172 菌株皆培養於 PDA 培養約 8 d 待其產孢後，以無菌水配製約 200 spores 20 μL^{-1} 之孢子懸浮液，置於八孔載玻片上，並將玻片保濕於玻璃培養皿中，分別靜置於 4℃、8℃、12℃、16℃、20℃、24℃、28℃、32℃、36℃及 40℃之定溫箱中，24 h 後取出於顯微鏡下觀察孢子發芽情形，每個處理 4 重複，本試驗重複進行 2 次。

不同小花蕙蘭品種對葉細斑病之感病性

供試小花蕙蘭品種計有報歲蘭 (*Cymibium sinense*)、春蘭 (*C. goeringii*)、「富山」四季蘭 (*C. ensifolium* 'Fu-shan')、「市長紅」四季蘭 (*C. ensifolium* 'Shih-jhang-hong')、「彩虹」四季蘭 (*C. ensifolium* 'Tsai-hong') 及「鐵骨素心」四季蘭 (*C. ensifolium* 'Tie-gu-su-sin') 等 6 種不同小花蕙蘭品種品系。接種方式仿上述病原性測定模式，將 *F. proliferatum* Fp-172 菌株孢子懸浮液直接均勻噴霧於植株新芽部位 (約 1 mo 內，1–2 分芽)，隨即以塑膠袋套袋進行保濕，並置於 28℃定溫箱中，以無菌水作為對照組，每種蘭花品種處理 3 重複，每重複 4 株，每週觀察病徵進展情形，本試驗觀察至 28 d 止，本試驗重複進行 2 次。病害調查係計算小花蕙蘭植株葉片 (由內而外) 上病斑數，並將其分成 5 級，其中無病斑者為 0 級，葉片上病斑數在 1–10 個病斑為 1 級，11–25 個病斑為 2 級，26–50 個病斑為 3 級，51 個以上或基部褐化枯萎死亡現象為 4 級，再以下列公式求得葉片的罹病度 (disease severity)：罹病度 (%) = [Σ(指數 × 該等級罹病葉數)/(4 × 總調查葉數)] × 100。

四季蘭「彩虹」之不同齡期葉片對細斑病之感病性

將由小花蕙蘭葉細斑病病組織分離之 *F. proliferatum* 菌株 Fp-172 分離株培養於 PDA 培養基上，1 wk 後以無菌水將 PDA 上所產生之分生孢子洗下，並製成孢子懸浮液 (10^6 spores mL^{-1}) 供試驗葉片接種用。購買自南投縣魚池鄉黃先生園區內之「彩虹」四季蘭 (*C. ensifolium* 'Tsai hong') 植株，本試驗選取 2 wk (剛冒新芽)、1 mo (1–2 分芽)、1.5 mo (2–3 分芽)、2.5 mo (5 分芽)、3.5 mo (8 分芽) 及 4–5 mo (成熟葉，mature) 等 6 種不同齡期葉片後，將 Fp-172 分離株孢子懸浮液直接均勻噴佈於葉片上，每株噴施約 2–4 mL，接種後植株隨即以塑膠袋進行套袋保濕，並置於 28℃光照 12 h 定溫箱中，記錄每株植株病害發生情形，觀察至 28 d 止，對照組則以無菌水進行接種，每種處理 3 重複，每重複 4 株，試驗觀察 28 d，本試驗重複進行 2 次。依上述所示方法調查罹病度。

統計分析

各項處理之試驗資料利用 SAS 9.1 版統計分析軟體先進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，再以最小顯著性差異 (least significant difference; LSD) 測驗在 5% 顯著水準下，比較處理間平均值之差異。

結果

小花蕙蘭葉細斑病之病徵

本研究於種植四季蘭之「市長紅」、「彩虹」、「富山」、「鐵骨素心」品系及報歲蘭品種之小花蕙蘭園區陸續調查到葉細斑病發生，細斑病主要危害初生芽之葉片，在嫩葉上產生直徑約 2.3–8.7 mm 之細小圓形或不規則形黑褐色病斑，病斑周圍產生淡黃色暈環，葉片被病原菌感染後其病斑不再繼續擴大 (圖 1)。

小花蕙蘭葉細斑病菌之培養形態與分子鑑定

小花蕙蘭葉細斑病菌經單孢培養於 PDA 平板於 25℃黑暗培養 7 d 後，菌落為白色略帶淡淡紫色、菌絲綿密生長 (圖 2A)，利用滅菌後之針頭沾取菌落後，透過光學顯微鏡可觀察到分生孢子形態如圖 2B–E 所示，大孢子 (macroconidia) 為鐮刀形，無色，1–3 個隔膜，著生於分生孢子梗 (conidiophores) 之瓶狀枝上，大孢子大小為 17.9–41.0 μm × 3.8–2.1 μm；小孢子 (microconidia) 呈棍棒狀，一端扁平，無色，著生於分生孢子梗之瓶狀枝上，排列方式有假頭狀 (false heads) 或串生孢子鏈 (chains)，小孢子大小為 5.8–11.6 μm × 1.9–3.6 μm；無厚膜孢子 (chlamydospores) 產生。為進一步進行菌株種的鑑定，將 Fp-165 及 Fp-172 分離株之 ITS (accession No. 分別為 MG871252 及 MG871253) 序列及 *EF-1α* 基因部分序列 (accession No. 分別為 MH153751 及 MH153750)，與 NCBI 基因資料庫進行分析比對，結果供試菌株與 RS_79 isolate、Y. H. Yeh I0911 strain 之 ITS (MK332493 與 MK336501) 與 WG 8406 B2C3、GuangD7 strain 之 *EF-1α* (MH383509 與 KY85020) 之序列相似度高達 100%。依據本病害之病徵表現、病原菌形態特徵及分子鑑定結果，證明由葉細斑病罹病組織所分離之病原菌為 *F. proliferatum* (Leslie *et al*. 2006; Wang *et al*. 2018)。

小花蕙蘭葉細斑病之病原性測定

為進一步瞭解 *F. proliferatum* 於不同小花蕙蘭品種上之病原性，本研究將 Fp-172 分離株之孢子懸浮液直接噴布於報歲蘭、「富山」四季蘭及「彩虹」四季蘭之嫩葉上，於接種 10 d 後，報歲蘭嫩葉開始出現黑褐色斑點病斑，隨著接種天數增加，葉片上黑褐色斑點數隨之增加，於接種 30 d 後不僅有黑褐色斑點，且葉尖出現褐化枯萎現象 (圖 3A)。而當接種於「富山」四季蘭與「彩虹」四季蘭嫩葉上，則於接種 7 d 後開始出現黑褐色細小病斑，於接種 14 d 後葉片上黑褐色病斑更為明顯 (圖 3B–C)；另外，於接種 28 d 後，在「彩虹」四季蘭葉片上不僅有黑褐色斑點病徵，且葉片地基部黑褐化枯萎、葉片褐化後易抽起 (圖 3D)，之後再進行罹病組織分離，結果顯示所得菌株與接種病

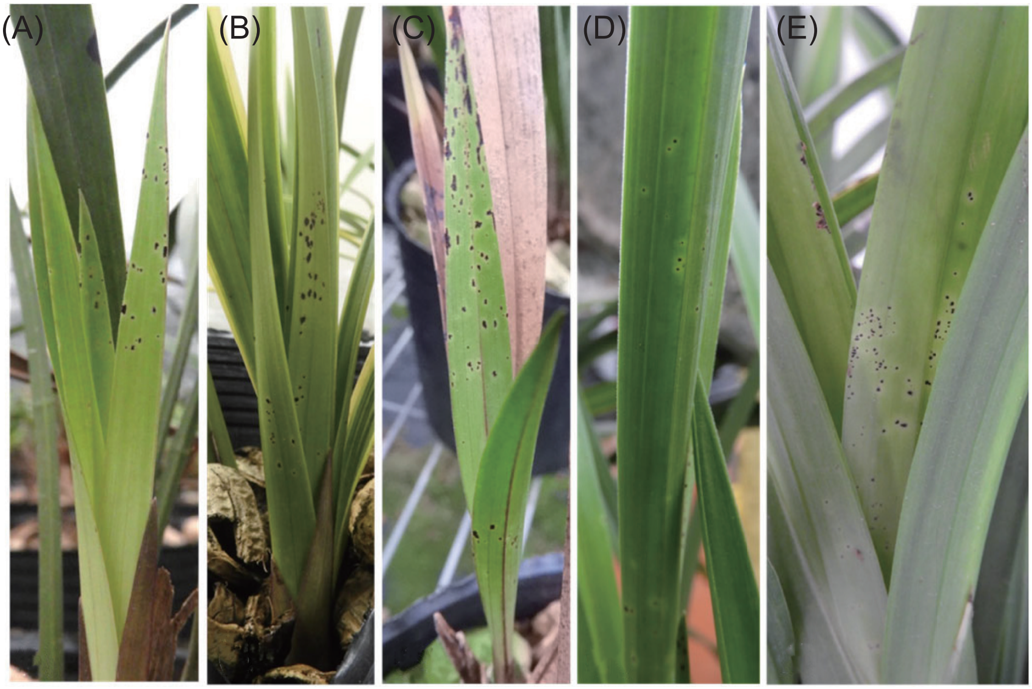

圖 1. 小花蕙蘭細斑病在葉片上病徵。(A)「市長紅」四季蘭；(B)「彩虹」四季蘭；(C)「富山」四季蘭；(D)「鐵骨素心」四季蘭；(E) 報歲蘭。

Fig. 1. Fleck spot symptoms of oriental cymbidium. Small spots with yellowish halo appeared on leaves of (A) *Cymbidium ensifolium* 'Shih-jhang-hong' cultivar; (B) *C. ensifolium* 'Tsai-hong' cultivar; (C) *C. ensifolium* 'Fu-shan' cultivar; (D) *C. ensifolium* 'Tieh-gu-su-sin' cultivar; and (E) *C. sinense*.

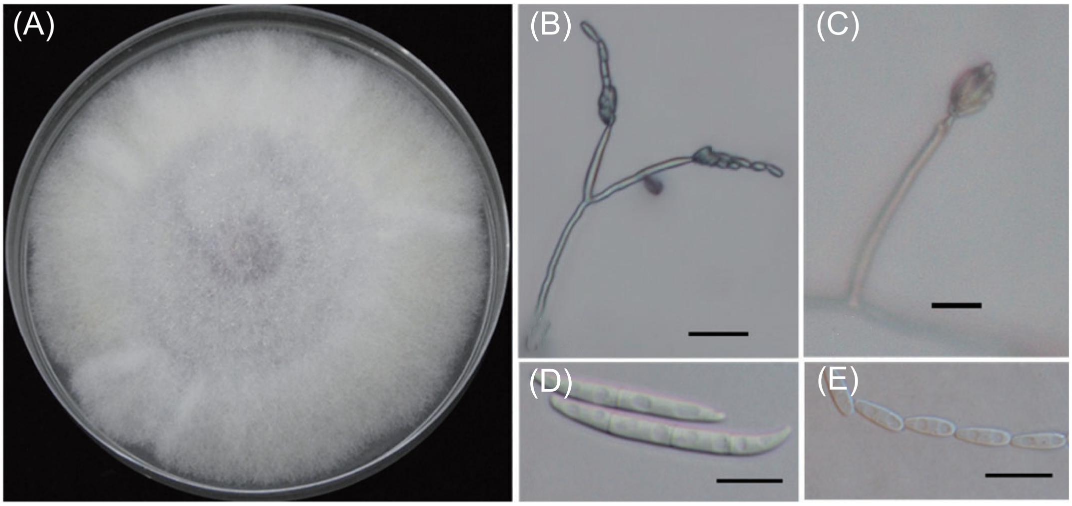

圖 2. 小花蕙蘭葉細斑病菌之形態特徵。(A) 小花蕙蘭葉細斑病菌於 PDA 培養基上於 25℃培養 7 d 後的菌落形態；(B) 小孢子呈鏈生狀排列；(C) 小孢子呈假頭狀排列；(D) 大孢子；(E) 小孢子。標尺 = 10 μm。

Fig. 2. Morphology of *Fusarium proliferatum*. (A) colony pattern of *F. proliferatum* cultured on potato dextrose agar (PDA) at 25℃ for 7 d; (B) microconidia produced in short chains; (C) microconidia produced in false heads; (D) morphology of macroconidia; and (E) microconidia. Bar = 10 μm.

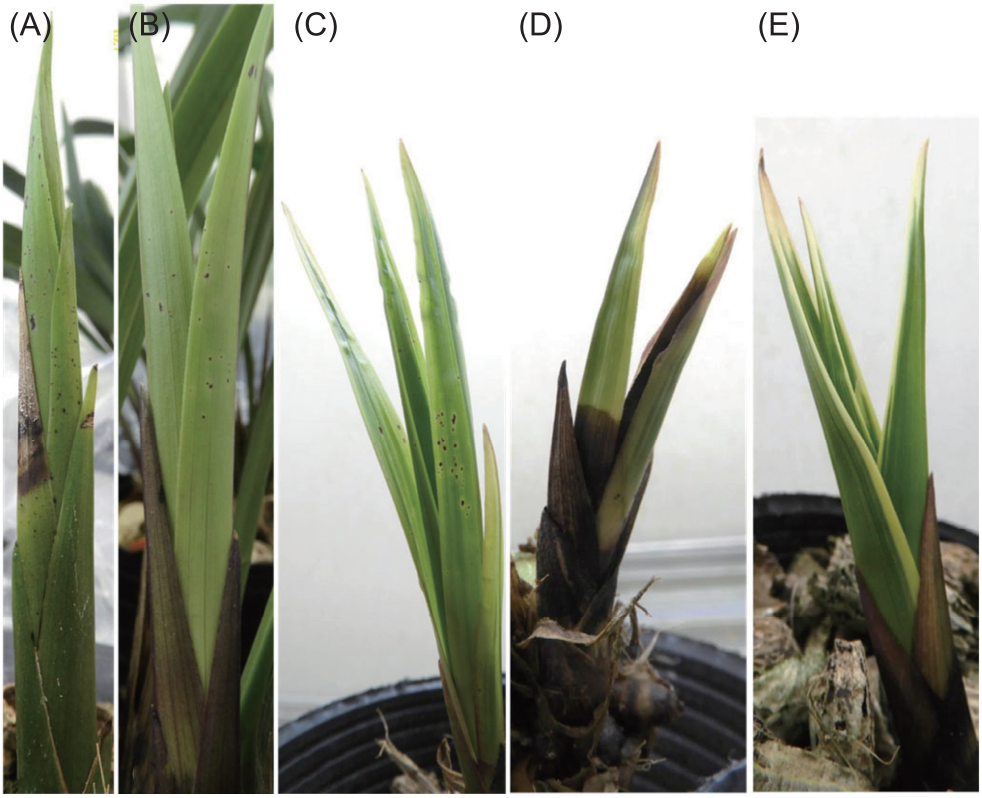

圖 3. 小花蕙蘭葉細斑病病原菌 (*Fusarium proliferatum* Fp-172) 分別接種於 (A) 報歲蘭；(B)「富山」四季蘭；(C、D)「彩虹」四季蘭葉片上之病徵表現，以 (E) 無菌水接種於「彩虹」四季蘭為對照組。

Fig. 3. Symptoms of fleck spot disease of oriental cymbidium appeared on leaves after artificial inoculation with conidial suspenseion of *Fusarium proliferatum* Fp-172. (A) Fleck spot on leaves of *Cymbidium sinense*; (B) *C. ensifolium* 'Fu-shan' cultivar; (C) *C. ensifolium* 'Tsai-hong' cultivar; (D) basal leaves brown rot on *C. ensifolium* 'Tsai-hong' cultivar; and (E) healthy leaves of *C. ensifolium* 'Tsai-hong' cultivar without artificial inoculation.

原菌菌株，其形態特徵皆相同，完成柯霍氏法則，證實 *F. proliferatum* 對報歲蘭與四季蘭具有病原性。

溫度對病原菌菌絲生長與孢子發芽之影響

小花蕙蘭葉細斑病菌菌絲塊培養於不同溫度之培養箱中，其生長結果如圖 4 所示，於 24℃培養時，病原之生長最為快速，於培養後 8 d 時 Fp-165 及 Fp-172 之平均生長直徑分別為 8.4 cm 與 8.2 cm；於 28℃培養時其平均生長直徑為 7.9 cm，而於 20℃及 32℃培養時其平均生長直徑皆約為 5.5 cm，於 16℃培養時其平均生長直徑約為 4.3 cm，於 12℃培養時其平均生長直徑約為 3.1 cm，於 8℃培養時其平均生長直徑則僅有 1.0 cm，而 4℃及 40℃培養時病原菌幾乎不生長。另外，溫度對本菌孢子發芽之影響結果則如圖 5 所示，Fp-165 菌株而言，其於 24–32℃時，發芽率可達 91% 以上，為最適孢子發芽之溫度。Fp-172 菌株，則以 24–28℃為最適發芽溫度，其發芽率可達 96% 以上，兩菌株在 8℃以下及 40℃時，孢子完全不發芽。

不同小花蕙蘭品種對葉細斑病之感病性

選取報歲蘭 (*C. sinense*)、春蘭 (*C. goeringii*)、「富山」四季蘭 (*C. ensifolium* 'Fu-shan')、「市長紅」四季蘭 (*C. ensifolium* 'Shih-jhang-hong')、「彩虹」四季蘭 (*C. ensifolium* 'Tsai-hong') 及「鐵骨素心」四季蘭 (*C. ensifo-

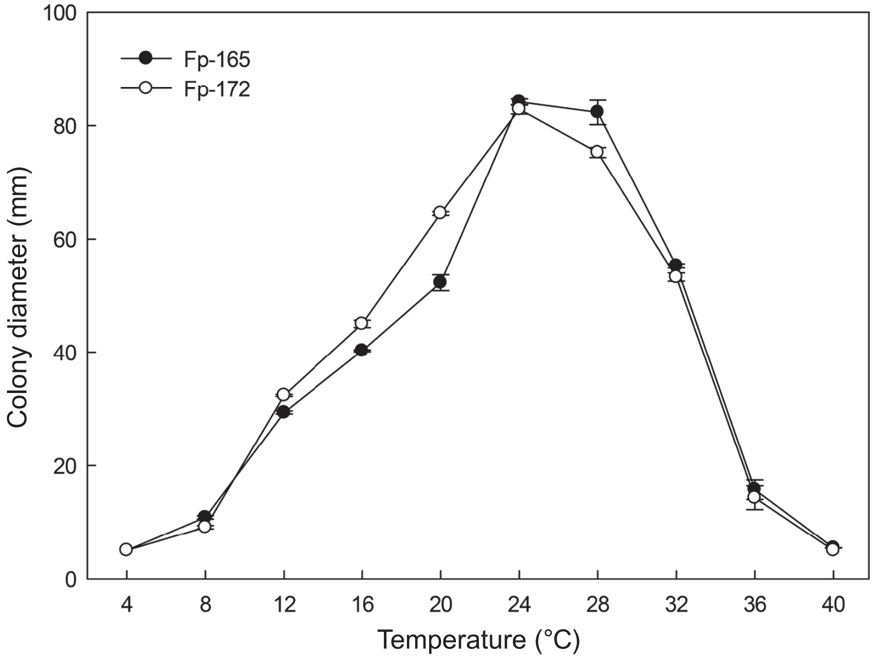

圖 4. 溫度對 *Fusarium proliferatum* Fp-165 及 Fp-172 分離株菌絲生長之影響 (在 PDA 平板培養 8 d)。

Fig. 4. Effect of temperature on mycelial growth of *Fusarium proliferatum* Fp-165 and Fp-172 isolates cultured on potato dextrose agar (PDA) plates for 8 days.

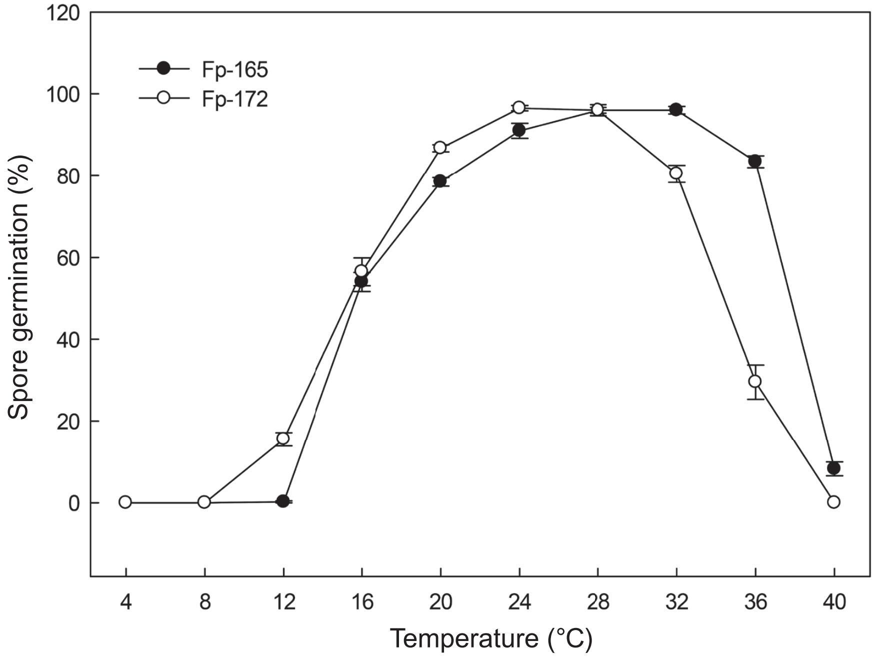

圖 5. 溫度對 *Fusarium proliferatum* Fp-165 及 Fp-172 分離株孢子發芽之影響。

Fig. 5. Effect of temperature on spore germination of *Fusarium proliferatum* Fp-165 and Fp-172 isolates.

lium ‘Tie-gu-su-sin’) 等 6 種不同小花蕙蘭品種，分別接種 *F. proliferatum* Fp-172 菌株孢子懸浮液於植株新芽部位 (約 1 mo 內，1–2 分芽)，於接種 12 wk 後，結果如表 1 所示，第 1 次試驗中，以「富山」四季蘭之罹病度為 72.9% 最高，其次為「彩虹」四季蘭、「鐵骨素心」四季蘭、「市長紅」四季蘭，罹病度分別為 70.0%、61.1%、60.0%，罹病度最低則為春蘭 9.4%；第 2 次試驗中，仍是以「富山」四季蘭之罹病度為 66.1% 最高，其次為「市長紅」四季蘭、「鐵骨素心」四季蘭、「彩虹」四季蘭，罹病度分別為 62.1%、47.2%、44.5%，罹病度最低則仍為春蘭 8.4%，與對照未處理間具有顯著性差異 ($P < 0.05$)。此外，在病害調查時發現成熟株 (苗齡超過 1 年) 的葉片雖有接種供試菌的分生孢子，但皆未出現任何細斑病的病徵。

四季蘭「彩虹」之不同齡期葉片對細斑病之感病性

由不同小花蕙蘭品種對葉細斑病之感病性試驗結果得知，「彩虹」四季蘭品種之罹病度高，且為目前主要栽種品種之一，因此本研究挑選「彩虹」四季蘭品種 (*C. ensifolium* ‘Tsai-hong’) 為試驗材料，幼葉齡期 (新芽齡期) 分為 2 wk (剛冒新芽)、1 mo (1–2 分芽)、1.5 mo (2–3 分芽)、2.5 mo (5 分芽)、3.5 mo (8 分芽) 及 4.5 mo (成熟葉，mature) 共 6 種程度齡期葉片，分別接種 *F. proliferatum* Fp-172 菌株孢子懸浮液，於接種 4 wk 後，結果如表 2 所示，由第 1 次及第 2 次試驗結果中，幼葉從剛

表 2. 「彩虹」四季蘭之不同齡期葉片對細斑病之感病性。

Table 2. Effect of shoot age on susceptibility of fleck spot disease of *Cymbidium ensifolium* ‘Tsai-hong’ inoculated with *Fusarium proliferatum* Fp-172 isolate for 4 wk.

	Disease severity (%)[z]	
Shoot age (months)	Experiment 1	Experiment 2
0.5	58.3 a[y]	59.3 a
1.0	52.8 a	62.5 a
1.5	49.3 a	29.2 b
2.5	13.9 b	25.9 b
3.5	2.8 b	14.6 bc
4.5	0.0 b	0.0 c
LSD	28.1	15.0

[z] The disease severity was recorded using a 0–4 rating index as follows: 0 = no symptoms, 1= fleck spot number 1–10, 2 = fleck spot number 11–25, 3 = fleck spot number 26–50, and 4 = > 51 of fleck spot number or necrotic to death of basal leaves. Disease severity (%) = $[(N_0 \times 0 + N_1 \times 1 + N_2 \times 2 + N_3 \times 3 + N_4 \times 4)/N \times 4] \times 100$.

[y] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by least significant difference (LSD) test.

表 1. 不同小花蕙蘭品種對葉細斑病之感病性。

Table 1. Susceptibility of fleck spot disease of different oriental cymbidium cultivars inoculated with *Fusarium proliferatum* Fp-172 isolate for 4 wk.

	Disease severity (%)[z]	
Cultivation	Experiment 1	Experiment 2
Cymbidium sinense	37.5 b[y]	33.3 c
C. goeringii	9.4 c	8.4 d
C. ensifolium ‘Fu-shan’	72.9 a	66.1 a
C. ensifolium ‘Shih-jhang-hong’	60.0 ab	62.1 a
C. ensifolium ‘Tsai-hong’	70.0 a	44.5 b
C. ensifolium ‘Tie-gu-su-sin’	61.1 a	47.2 b
CK	0.0 c	0.0 e
LSD	23.5	7.9

[z] The disease severity was recorded using a 0–4 rating index as follows: 0 = no symptoms, 1= fleck spot number 1–10, 2 = fleck spot number 11–25, 3 = fleck spot number 26–50, and 4 = > 51 of fleck spot number or necrotic to death of basal leaves. Disease severity (%) = $[(N_0 \times 0 + N_1 \times 1 + N_2 \times 2 + N_3 \times 3 + N_4 \times 4)/N \times 4] \times 100$.

[y] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by least significant difference (LSD) test.

冒新芽 2 wk 至 1 mo (1–2 分芽) 齡期其細斑病罹病度高達 52% 以上，其次為 1.5 mo (2–3 分芽) 齡期其細斑病罹病度分別為 49.3% 及 29.2%；當幼葉生長到 2.5 mo (5 分芽) 齡期則分別為 13.9% 及 25.9%；當幼葉到 3.5 mo (8 分芽) 齡期其細斑病罹病度降至 15% 以下，當幼葉轉成成熟葉片 (4–5 mo) 則細斑病皆不發生。

討論

小花蕙蘭俗稱國蘭，為蕙蘭屬 (*Cymbidium*) 蘭科植物，是台灣主要經濟栽種的蘭花之一。台灣小花蕙蘭是以外銷為主的產業，每年外銷產值約 1 千萬美元，其中植株是以芽計價。本研究由田間病害調查得知，細斑病為小花蕙蘭於幼葉時期重要病害之一，在嫩葉上產生細小黑褐色圓形或不規則形病斑，病斑周圍有淡黃色暈環，有時會在葉片基部產生黑褐化大型病斑，甚或造成芽體枯萎現象，嚴重影響植株的商品價值。本試驗由葉細斑病病斑進行組織分離純化後，經培養特性、核酸序列比對及柯霍式法則確定引起小花蕙蘭葉細斑病之病原為 *F. proliferatum*。在美國、日本、澳洲、德國及韓國皆曾報導，*F. proliferatum* 為蘭花病原菌之一，不僅危害蕙蘭 (*Cymbidium*)，亦對齒舌蘭 (*Odontioda*)、石斛蘭 (*Dendrobium*)、文心蘭 (*Oncidium*) 及嘉得麗雅蘭 (*Cattleya*) 等造成黑褐色、黃色葉部病斑；在蕙蘭 (*Cymbidium*)、石斛蘭 (*Dendrobium*) 及蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis*) 造成莖部與根部腐爛 (Chang *et al*. 1998; Ichikawa & Aoki 2000; Latiffah *et al*. 2009; Zakaria *et al*. 2009; Swett & Uchida 2015; Srivastava *et al*. 2018; Wang *et al*. 2018)。在鐮孢菌屬 (*Fusarium*) 中，引起蕙蘭 (*Cymbidium*) 葉片產生病斑 (leaf spot) 之病原除了 *F. proliferatum* 外，還包含 *F. fractiflexum* 與 *F. subglutinans*，其中 *F. fractiflexum* 感染葉片產生黃色病斑；而 *F. subglutinans* 則初期產生細小黃斑，漸漸地轉變成黑褐色至黑色病斑、病斑外圍具黃暈，逐漸擴大呈黑褐色凹陷病斑，病斑邊緣微凸起狀，後期老舊病斑中央呈空心狀，最後使葉片變形而失去商品價值 (Broadhurst 1996; Ichikawa & Aoki 2000; Aoki *et al*. 2001; Ichikawa 2004; Han *et al*. 2015; Ruan *et al*. 2021)，與本研究由 *F. proliferatum* 引起葉片黑褐色斑點病徵有差異，然而 *F. fractiflexum* 與 *F. subglutinans* 目前在台灣無任何紀錄可引起蘭科作物病害 (Wang *et al*. 2018)，這部分仍有待未來進一步釐清。

鐮孢菌屬 (Genus *Fusarium*) 為一大群的菌絲狀真菌，歸屬於叢赤殼科 (Family Nectriaceae)，廣泛分布於果園、苗圃、溫室及田間，可在任何土壤中殘存好幾年。鐮孢菌屬 (*Fusarium* sp.) 在自然界扮演多重角色，有些菌株以腐生性 (saprophytes) 方式殘存於土壤中，有些菌株以內寄生 (endophytic) 方式存於植物體內，有些則是以致病性 (pathogenic) 方式感染植株任何部位，產生頸腐 (crown)、根腐 (root rot)、莖腐 (stalk rot)、葉斑 (leaf spot)、葉片枯萎 (leaf blight)、葉片腐爛 (leaf rot)、幼鞘腐爛 (sheath rot) 及維管束萎凋 (vascular wilt) 等病徵表現，其中具病原性鐮孢菌 (*Fusarium* spp.) 是栽培高經濟蘭花主要限制因子之一 (Srivastava *et al*. 2018)。對蘭花具病原性鐮孢病菌包含 *F. proliferatum*、*F. oxysporum*、*F. solani*、*F. subglutinans*, *F. fractiflexum* 及 *F.circinatum* 等 (Latiffah *et al*. 2009; Srivastava *et al*. 2018; Wang *et al*. 2018)，其中以 *F. proliferatum* 為台灣小花蕙蘭葉部病害主要病原菌之一。本研究測試溫度對 *F. proliferatum* 分離株菌絲生長與孢子發芽的影響，結果發現 24–28℃為本菌菌絲生長最適溫度，20–32℃為本菌孢子發芽最適溫度，顯示本菌適應溫度範圍廣，台灣的亞熱帶氣候條件下有利本病原菌之發芽與侵染。

於 Fp-172 菌株病原性測試結果，指出該菌株對報歲蘭 (*C. sinense*)、春蘭 (*C. goeringii*) 及四季蘭 (*C. ensifolium*) (「富山」、「市長紅」、「彩虹」及「鐵骨素心」) 均具有病原性，以罹病度來看，對四季蘭的病原性較強，且由試驗結果顯示，*F. proliferatum* 對小花蕙蘭目前主力品種四季蘭與報歲蘭皆具有威脅性，應注意防治。另外，從文獻得知，鐮孢菌屬 (Ge-

nus *Fusarium*) 易危害種苗及幼嫩芽部位，當幼嫩植株被鐮孢病菌侵入感染後，不利於植株生長，有時甚至出現死亡，造成植株嚴重損失 (Srivastava *et al*. 2018)。從台灣田間病害發生情形觀察，初步得知 *F. proliferatum* 引起的細斑病主要好發於新芽、嫩葉時期，與國外有類似現象；又小花蕙蘭幼葉生長健康與否，與植株商品價值直接相關，因此為了進一步瞭解幼葉葉齡對本病原菌之感受性，以人工接種方式將 *F. proliferatum* 孢子懸浮液噴施於「彩虹」四季蘭之不同齡期幼葉上，評估該病原對各齡期葉片之感受性差異，可作為後續防治葉細斑病時確實掌握最佳防治時機之依據。由試驗結果得知，新芽萌發到生長 2 wk 至 1 mo (冒新芽至 1–2 分芽) 幼葉齡期時其細斑病罹病度高達 52% 以上，2.5 mo (5 分芽) 幼葉葉齡期時仍有 25% 罹病度，但 3.5 mo (8 分芽) 幼葉齡期齡期時其細斑病罹病度降至 15% 以下，而幼葉轉成成熟葉片時則細斑病皆不發生。值得注意的是，在進行 *F. proliferatum* 細斑病菌對不同小花蕙蘭品種接種測試時，未在四季蘭、報歲蘭及春蘭之成熟葉片上觀察到細斑病病徵的產生。另外，幼葉齡期被細斑病菌感染後，逐漸生長為成熟葉，再從成熟葉上病斑進行分離，仍然可分離到細斑病菌，顯示此病原菌可殘存在成熟葉片上，且可能仍具有感染力，因此建議本病害防治仍應將出現病徵的幼葉及成熟葉一併摘除並帶離園區，以降低田間感染源密度。

本研究報導台灣小花蕙蘭葉細斑病主要由 *F. proliferatum* 病原所引起，除 *F. proliferatum* 外，是否還有其他種類鐮孢菌屬病原，又其發病生態、生長適溫及寄主作物感受性是否有所差異，仍有待未來進一步探討。目前小花蕙蘭之主要栽培品種 (品系) 皆屬於感病品種，如報歲蘭、四季蘭之「富山」、「鐵骨」、「彩虹」及「市長紅」等。有關各齡期葉片對本病原菌之感病性試驗，結果顯示新芽萌發生長 2 wk 至 1.5 mo (剛冒新芽至 3 分芽) 時期為本病害好發時機，隨著嫩芽幼葉越趨成熟，則對本病原菌越具耐病性，因此得知小花蕙蘭於抽梢期 (春梢期、秋梢期) 之嫩芽、嫩葉為感病部位，田間栽培時應特別注意 *F. proliferatum* 之侵染，加強田間防治作業，避免植株失去商品價值而造成嚴重損失。未來仍待持續進行如化學防治、物理防治或生物防治等防治方法的評估，期能提供防治本病害之有效解決方案。

誌謝

本研究工作承黎貴枝小姐、張立詳小姐、鄭淑貞小姐及曾淑瓊小姐協助試驗進行，特此致謝。

引用文獻

Aoki, T., K. O'Donnell, and K. Ichikawa. 2001. *Fusarium fractiflexum* sp. nov. and two other species within the *Gibberella fujikuroi* species complex recently discovered in Japan that form aerial conidia in false heads. Mycoscience 42:461−478. doi:10.1007/BF02464343

Broadhurst, P. G. 1996. Occurrence of *Fusarium subglutinans* on *Cymbidium* orchids in New Zealand. Plant Dis. 80:711. doi:10.1094/PD-80-0711D

Chang, M., I. K. Hyun, Y. H. Lee, and D. H. Lee. 1998. Leaf spot of *Cymbidium* hybrida caused by *Fusarium proliferatum*. Korean J. Plant. Pathol. 14:664−667. (in Korean with English abstract)

Chen, U. C., J. H. Huang, and T. F. Hsieh. 2015. Effect of rainproof rolling blinds on improvement of disease prevention of oriental cymbidium. p.111−125. *in*: Proceeding of Chinese Cymbidium Industry Conference. November 17, 2015. Nantou, Taiwan. Taichung Dist. Agric. Res. Ext. Sta. Publ., Taichung, Taiwan. (in Chinese)

Cong, L. L., Y. Sun, J. M. Kang, M. N. Li, R. C. Long, T. J. Zhang, and Q. C. Yang. 2016. First report of root rot disease caused by *Fusarium proliferatum* on alfalfa in China. Plant Dis. 100:2526. doi:10.1094/PDIS-04-16-0505-PDN

Du Puy, D. and P. Cribb. 2007. The Genus Cymbidium. Kew Publishing. Kew, UK. 369 pp.

Geiser, D. M., M. del Mar Jiménez-Gasco, S. Kang, I. Makalowska, N. Veeraraghavan, T. J. Ward, N. Zhang, G. A. Kuldau, and K. O'Donnell. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. Eur. J. Plant Pathol. 110:473–479. doi:10.1023/B:EJPP.0000032386.75915.a0

Han, K. S., J. H. Park, C. G. Back, and M. J. Park. 2015. First report of *Fusarium subglutinans* causing leaf spot disease on *Cymbidium* orchids in

Korea. Mycobiology 43:343−346. doi:10.5941/MYCO.2015.43.3.343

Hsu, J. H. 2010. The role of pseudobulb on the growth of epiphytic orchids. p.154–162. *in*: Special Issue, No. 105. (Tsai, Y. F., ed.) Taichung Dist. Agric. Res. Ext. Sta. Taichung, Taiwan. 248 pp. (in Chinese)

Hsu, S. T., T. T. Chang, C. A. Chang, J. L. Tsai, and T. T. Tsay. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan. 4th ed. Taiwan Phytopathology Society. Taichung, Taiwan. 386 pp. (in Chinese)

Huang, C. W., J. H. Huang, Y. C. Li, C. W. Chen, and T. F. Hsieh. 2020. Pseudobulb rot of *Cymbidium* caused by *Fusarium oxysporum*. J. Taiwan Agric. Res. 69:65−76. doi:10.6156/JTAR.202003_69(1).0005 (in Chinese with English abstract)

Hung, H. C., F. M. Wei, and C. S. Chang. 2010. Chinese Cymbidium Production Operations Manual. Taichung Dist. Agric. Res. Ext. Sta. Spec. Publ. No. 106. Taichung, Taiwan. 135 pp. (in Chinese)

Hung, H. C., M. H. Wang, and F. H. Chang. 2017. Effects of tissue culture plantlet size on the seedling growth performance of Cymbidium. Bulletin of TDARES. Taichung. 135:39−45. (in Chinese with English abstract)

Ichikawa, K. and T. Aoki. 2000. New leaf spot disease of Cymbidium species caused by *Fusarium subglutinans* and *Fusarium proliferatum*. J. Gen. Plant pathol. 66:213−218. doi:10.1007/PL00012948

Ichikawa, K. 2004. The research of new leaf spot disease of *Cymbidium* species- The movement and control of Cymbidium yellow spot caused by *Fusarium proliferatum* and *Fusarium fractiflexum*. Bulletin of the Yamanashi Agricultural Research. 16:1−51. (in Japanese)

Latiffah, Z., M. Z. Nur-Hayati, S. Baharuddin, and Z. Maziah. 2009. Identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with root rot and stem rot of *Dendrobium*. Asian J. Plant Pathol. 3:14−21. doi:10.3923/ajppaj.2009.14.21

Lee, H. B., C. J. Kim, H. Y. Mun, H. S. Choi, Y. H. Lee, and H. O. Yun. 2011. First report of crown rot on gypsophila (*Gypsophila paniculata*) caused by *Fusarium proliferatum* in Korea. Plant Dis. 95:220. doi:10.1094/PDIS-05-10-0376

Leslie, J. F., B. A. Summerell, and S. Bullock. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell. Iowa, IA. 388 pp.

Li, B. J., W. X. Yan, Y. X. Shi, A. L. Chai, and X. W. Xie. 2018. First report of daylily flower rot caused by *Fusarium proliferatum* in China. Plant Dis. 102:825. doi:10.1094/PDIS-07-17-0997-PDN

Lin, C. L. 2015. Taiwan cymbidium industry overview. p.3–20. *in*: Proceeding of Chinese Cymbidium Industry Conference. November 17, 2015. Nantou, Taiwan. Taichung Dist. Agric. Res. Ext. Sta. Publ., Taichung, Taiwan. (in Chinese)

O’Donnell, K., H. C. Kistler, E. Cigelnik, and R. C. Ploetz.1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:2044−2049. doi:10.1073/pnas.95.5.2044

Ruan, R., X. Zhnag, C. Li, F. Zhao, M. Wang, and Q. Fu. 2021. First report of *Fusarium subglutinans* causing heart rot on *Cymbidium hybridum* in China. Plant protection. 144:105603. doi:10.1016/j.cropro.2021.105603

Srivastava, S., C. Kadooka, and J. Y. Uchida. 2018. Fusarium species as pathogen on orchids. Microbiol. Res. 207:188−195. doi:10.1016/j.micres.2017.12.002

Stewart, J. E., K. Otto, G. A. Cline, R. K. Dumroese, N. B. Klopfenstein, and M. S. Kim. 2016. First report of *Fusarium proliferatum* causing Fusarium root disease on sugar pine (*Pinus lambertiana*) in a forest container nursery in California. Plant Dis. 100:2534. doi:10.1094/PDIS-06-16-0909-PDN

Su, J. F., Y. H. Chen, L. Y. Chien, J. H. Huang, and T. F. Hsieh. 2011. First report of Amaryllis red spot disease caused by *Fusarium proliferatum* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 20:78−89. doi:10.6649/PPB.201112_20(3_4).0003 (in Chinese with English abstract)

Summerell, B. A., J. F. Leslie, D. Backhouse, W. L. Bryden, and L. W. Burgess. 2001. *Fusarium*: Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press. St. Paul, MN. 408 pp.

Swett, C. L. and J. Y. Uchida. 2015. Characterization of *Fusarium* diseases on commercially grown orchids in Hawaii. Plant Pathol. 64:648−654. doi:10.1111/ppa.12290

Wang, C. J., Y. J. Chen, Y. C. Jain, W. C. Chung, C. L. Wang, and W. H. Chung. 2018. Identification of *Fusarium proliferatum* causing leaf spots on *Cymbidium* orchids in Taiwan. J. Phytopathol. 166:675−685. doi:10.1111/jph.12730

White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1989. Amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes for phylogenetics. p.315−322. *in*: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. (Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds.) Academic Press. San Diego, CA. 482 pp. doi:10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1

Wu, R. S. and J. W. Huang. 1997. A major causal agent of lily seedling blight: *Fusarium proliferatum*. Plant

Pathol. Bull. 6:103−110. (in Chinese with English abstract)

Zakaria, L., L. H. M. D. Zain, B. Salleh, and M. Zakaria. 2009. Morphological and RAPD analysis of *Fusarium* species associated with root and stem rot of *Dendrobium* orchid in Northern Peninsula Malaysia. HAYATI J. Biosci. 16:64−68. doi:10.4308/hjb.16.2.64

Characteristics of Growth and Infection of *Fusarium proliferatum* Causing Fleck Spot on Oriental Cymbidium Leaf in Taiwan

Chiao-Wen Huang[1,*], Jin-Hsing Huang[2], and Ting-Fang Hsieh[3]

Abstract

Huang, C. W., J. H. Huang, and T. F. Hsieh. 2022. Characteristics of growth and infection of *Fusarium proliferatum* causing fleck spot on oriental cymbidium leaf in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 71(1):35–47.

Fleck spot disease is critical for oriental cymbidium cultivation owing to decreasing the appearance quality of plants. The main symptom is circular or irregular fleck lesions in black to brown on young leaves with or without a yellowish halo around the lesions. Occasionally in severe disease conditions, young shoots showed browning rot of basal leaves and shoot death. A species of fungus was isolated from the diseased tissue and identified as *Fusarium proliferatum* based on morphological characters, nucleotide sequence comparison of internal transcribed spacer (ITS), and translation elongation factor 1 alpha (*TEF-1α*) gene. Pathogenicity tests were carried out by artificial inoculation with conidial suspensions of the tested fungus to fulfill Koch's postulates. The optimal temperatures for mycelial growth and spore germination of *F. proliferatum* were 24−28℃ and 20−32℃ , respectively. Seven oriental cymbidium cultivars including *Cymbidium ensifolium*, *C. sinense* and *C. goeringii*, showed brown-to-black fleck lesions on young leaves, but no symptom appeared on mature leaves after artificial inoculation. To investigate the effect of shoot age on the susceptibility of fleck spot disease, potted oriental cymbidium (*C. ensifolium* 'Tsai-hong' cultivar) contained different ages of shoots were inoculated with conidial suspension at 28℃ . Results showed that disease severities of 0.5, 1.0, 1.5, 2.5, 3.5 and 4.5-month-old of shoots were 58.3−59.3%, 52.8−62.5%, 29.2−49.3%, 13.9−25.9%, 2.8−14.6% and 0%, respectively; whereas the adult shoots showed no fleck spot symptoms. The above results might provide the information for controlling fleck spot of oriental cymbidium caused by *F. proliferatum*.

Key words: Oriental cymbidium, Fleck spot, *Fusarium proliferatum*.

Received: August 11, 2021; Accepted: October 15, 2021.
[*] Corresponding author, e-mail: cwhuang@tari.gov.tw
[1] Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[2] Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[3] Research Fellow and Division Director, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 71(1):49–72 (2022)
DOI:10.6156/JTAR.202203_71(1).0005

研究報告

比較不同模式耦合溫度變化與農地變異模擬結球萵苣的生長

陳柱中 [1,2]　李達源 [3]　莊愷瑋 [4,*]

摘要

陳柱中、李達源、莊愷瑋。2022。比較不同模式耦合溫度變化與農地變異模擬結球萵苣的生長。台灣農業研究 71(1):49–72。

結球型萵苣 (*Lactuca sativa* L.) 是台灣秋冬季出口的指標蔬菜作物，由於植株結球的表徵特性易受夏季高溫限制，所以在台灣的主要栽培季節固定從秋末至隔年晚春；就植株生長過程，已展開外葉是光合產物的主要供源，其葉球是積儲也是生產標的，外葉生長表現將是主導葉球產量的首要栽培管理指標。線性 (LIN)、Gopertz (GOP) 和 Logistic (LOG) 模式是使用最普遍的生長模式，因應不同作物生長特性之差異，生長模式的最佳化是提升智慧農業的作物栽培管理效益所不可或缺。本研究依據相對葉生長率 (relative leaf-growth rate; RLR) 和相對生長速率 (relative growth rate; RGR) 之定義為建構結球萵苣生長模式的理論基礎，以 LIN、GOP 和 LOG 模式套配地上部乾重和外葉面積的生長曲線；並考慮產期溫度變化和農地變異，提出模式耦合程序改善不同期作溫度差異和不同田區環境差異造成的模擬預測偏差。本研究的試驗區位於雲林縣二崙鄉和麥寮鄉，試驗田區地號包括：二崙鄉油車段 427 號和公館段 382 號、麥寮鄉山寮段 474 號和 550 號；於 2017 年和 2018 年在 427 號與 382 號田區各進行 1 期試驗，於 2017 年在 474 號和 550 號田區各進行 1 期試驗，共彙集 6 組結球萵苣的試驗資料供模式套配評估與驗證。結果顯示，LIN、GOP 和 LOG 模式皆適用於描述外葉面積和地上部乾重的生長曲線，但各模式的適配性可能因期作氣候及田區環境差異的影響而有差異，套配模式估算的參數 a 和 b 不僅可供說明生育期間 RGR 和 RLR 的變動趨勢，而且可用於溫度耦合方程式 $a(\mathrm{T})$ 和 $b(\mathrm{T})$ 評估季節性溫度差異對植株生長速率的影響，並估算出耦合參數 a' 和 b'；再由溫度耦合方程式結合特定田區 (S) 的植株生長資料，可估算出耦合參數 c'。依據 3 種模式的定義代入耦合參數值：a'、b' 及 c'，即可獲得各模式同時耦合溫度變化及農地變異的生長模擬函數：$\mathrm{F_S}(\mathrm{t} \mid a', b', c')_{\mathrm{LIN}}$、$\mathrm{F_S}(\mathrm{t} \mid a', b', c')_{\mathrm{GOP}}$ 和 $\mathrm{F_S}(\mathrm{t} \mid a', b', c')_{\mathrm{LOG}}$。耦合模擬結果顯示，相較 LIN 和 GOP 模式，以 LOG 模式耦合模擬外葉面積和地上部乾重在生育期後段的預測準確度高，較有利準確推估最適採收期與最終收穫產量，若以耦合程序的操作及應用性考量，以普遍適用的 LIN 和 GOP 模式可被優先選擇。

關鍵詞：生長分析、模式耦合、線性模式、Gopertz 模式、Logistic 模式。

前言

當前台灣推動智慧農業 (smart agriculture) 的策略包括 3 大面向：以跨域智農聯盟推動關鍵技術的開發應用、整合資通訊技術提供多元化數位農業服務、以互動科技創新產銷溝通平台，將引領未來台灣農業朝向「效率、安全、低風險」的發展目標 (Chen & Yang 2017)；由行政院農業委員會主導的智慧農業相關計畫，也定位在智慧生產與數位服務 2 大主軸，被優先選定的推動項目中屬於作物栽培類的包括：蝴蝶蘭、種苗、菇類、稻作、茶、毛豆、鳳梨和結球萵苣等 (Yang *et al*. 2016)。

投稿日期：2021 年 8 月 31 日；接受日期：2021 年 11 月 15 日。
[*] 通訊作者：kwjuang@mail.ncyu.edu.tw
[1] 國立台灣大學農業化學系博士班研究生。台灣 台北市。
[2] 農委會農業試驗所農業化學組副研究員。台灣 台中市。
[3] 國立台灣大學農業化學系教授。台灣 台北市。
[4] 國立嘉義大學農藝學系教授。台灣 嘉義市。

結球萵苣是被列入智慧農業優先推動項目的代表性外銷農產品之一，農委會自 2002 年開始辦理「外銷結球萵苣生產及採後處理技術示範輔導」計畫，已建立有效的生產及運銷模式，更積極輔導農民團體設置結球萵苣外銷生產專區，主要集中在雲林縣麥寮、崙背、二崙、褒忠等鄉，每年 11 月至翌年 3 月為盛產期，外銷市場以鄰近日本為主，至 2021 年台灣外銷需求的結球萵苣生產目標面積達 800 ha、產量目標達 21,000 Mg (Chen & Wang 2021)。因應智慧農業的發展趨勢，未來國內結球萵苣生產栽培技術的智慧化管理勢在必行，現行智慧農業的作物生產管理技術包括：遙測技術 (remote sensing; RS)、全球定位系統 (global positioning system; GPS)、地理資訊系統 (geographic information system; GIS)、專家系統 (expert system; ES)、決策知識系統及大數據分析等軟硬體設施 (Chen & Yang 2017)，智慧化的栽培管理就是運用這些軟硬體技術，即時監控現地農作生產過程，並連結土壤速測、病蟲害監測和氣象預測模擬的整合評估分析，以供管理決策之依據 (Saiz-Rubio & Rovira-Más 2020)。

以田間作物栽培和產銷調節為需求的智慧化管理，必須先經由作物生長模式提供植株生長過程的精準模擬和正確推估，以供決策知識系統提出預測結果的比對分析和評估 (McCown *et al*. 1996; Jones *et al*. 2001, 2003)，目前既有不同類別作物之生長模式經模組化格式 (modular format)，已被整合開發出便利使用者操作的作物系統模式 (crop system model) (Jones *et al*. 2017; Hoogenboom *et al*. 2019; Muller & Martre 2019)。因此，作物模式的開發已不再只是概念模型的評估研究，必須兼顧理論演算與更新監測數據的修正，可被直接應用於田間生產管理及改善栽培技術的模擬驗證，以模擬推估出可靠的量化參數代表植株生長過程的變異；若這些生長變異的原因來自品種、栽培管理或氣候條件，則推估模擬所得之量化參數便可供品種選拔、栽培技術或耕作制度的調整依據和參考建議 (Parenti *et al*. 2021)。考慮目前台灣結球萵苣產業發展所需，選定既有品種和目前已具經濟規模之慣行栽培技術和耕作制度，依據代表性產區的田間生產紀錄，建構出穩定適用的生長模式，即可供後續農地田區規劃、栽培技術、產期調節和產量預估等田間生產程序的決策依據。

綜觀現有應用於田間試驗與栽培管理的作物生長模式，可略分 2 類：機制型和經驗型。機制型模式的應用需先假設植株生長過程吻合特定生長參數組成之時間函數，將植株生長試驗的紀錄資料套配上機制型模式，依不同試驗條件與栽培技術的植株生長紀錄，可估算出生長參數的差異，說明不同生長條件與處理變因對植株生長過程的影響 (Paine *et al*. 2012; Koester *et al*. 2014; Weraduwage *et al*. 2015; de Bem *et al*. 2018)。經驗型模式以優先選取對植株生長紀錄適配性最佳之時間函數，再經試驗條件和栽培技術相近但不同試驗來源的資料進行驗證，可供特定栽培系統監測植株生長趨勢、控管生長變異及預測產量動態之用 (Tei *et al*. 1996; Shimizu *et al*. 2008; Fraile-Robayo *et al*. 2017; Chen *et al*. 2019)。為兼顧作物生長模式能應用於評估生長變異、優化生產制度和改善栽培技術，又能對生長趨勢具有準確的預測效力，結合機制型和經驗型模式的模式耦合 (models coupling) 是常被使用的策略，模式耦合的用途多在整合多重機制和變因的影響，常用的耦合方式：合併 (combination)、嵌入 (embedding) 和轉換 (transformation)，合併可將 2 種以上模式重組 (Mischan *et al*. 2015; Fernandes *et al*. 2017)，嵌入可將主模式之參數以次模式導入，再新增變因和參數 (Boote *et al*. 2013; Tsakmakis *et al*. 2017; Morrison & Cunha 2020; Beyene *et al*. 2021; Shahhosseini *et al*. 2021)，轉換可將主模式之參數導入不同維度或資料類型的轉換函數 (López-Cruz *et al*. 2004; Roux *et al*. 2014; Babcock *et al*. 2016; Siad *et al*. 2019)。目前，作物模式的發展趨勢是以程序基礎的模式化 (process-based modeling; PBM) 概念為主流，依據生理機制的反應原理和作用過程，經最佳化的模式耦合程序，將影響植株生長的不同因子導入 (Goudriaan & van Laar 1994; Buck-Sorlin 2013)，發展出可用於整合涵蓋品種、環境和管理等多元變因之栽培系統模式 (cropping system model; CSM)，例如Decision Support System for Agrotechnology

Transfer (DSSAT) 系統 (Jones *et al*. 2003; Hoogenboom *et al*. 2019)。

生長分析 (growth analysis) 是傳統作物選育品種、改善栽培技術或提升田間生產管理效率的必備程序，先設計不同背景環境和處理條件的田間試驗，經生長分析說明影響植株生長變異的因素，再藉以評估育種效益及改善栽培管理的策略。所謂生長分析就是檢查植株生長表現的數值變化，由觀測資料計算代表植株生長反應的指標，藉以評估造成生長變異及影響反應速率的機制或關鍵因素，這些指標包括：相對生長率 (relative growth rate; RGR)、相對葉生長率 (relative leaf-growth rate; RLR)、葉面積比 (leaf area ratio; LAR) (Radford 1967)、淨同化率 (net assimilation rate; NAR) (Williams 1946)、葉面積指數 (leaf area index; LAI) (Watson 1958) 和收穫指數 (harvest index; HI) (Bhatt 1976) 等，這些生長分析指標也是開發作物生長模式的理論起源和假設基礎 (Briggs *et al*. 1920a, 1920b; West *et al*. 1920)。若以植物行光合作用產生碳水化合物代表植株的生長反應，光合產物分配累積之生物量 (w) 即表示生長反應過程的終點表現 (endpoints)，相對生長速率 (RGR) 是生物量累積速率的有效指標，可精確說明光合產物的生成效率：

$$RGR = 1/w \cdot dw/dt, \qquad (1)$$

其中 t 表示生長時間。再者，植株葉片承載光照面積是直接影響光合產物生成量的關鍵因素，葉片伸展面積擴大會改變光合產物的生成效率、分配與累積，相對葉生長率 (RLR) 是葉面積 (A) 擴大速率的指標：

$$RLR = 1/A \cdot dA/dt, \qquad (2)$$

解析 RLR 對應 RGR 的連動關係，即可說明植株光合產物分配與累積的生理調節機制 (Potter & Jones 1977)。若假設 RGR 和 RLR 隨時間改變的趨勢分別為時間 t 的函數 $f_w(t)$ 與 $f_A(t)$，式 (1) 和式 (2) 可分別被改寫成式 (3) 和式 (4)：

$$\ln(w) = \int f_w(t)dt \qquad (3)$$

和

$$\ln(A) = \int f_A(t)dt, \qquad (4)$$

將生物量和葉面積的試驗資料取對數轉換後套配式 (3) 和式 (4)，即可建構出對數化生物量和葉面積的生長模式 ln[w(t)] 和 ln[A(t)]；換言之，$f_w(t)$ 和 $f_A(t)$ 分別是對數化生物量和葉面積生長模式的切線斜率。生長分析之其他指標皆可依定義 (Fakorede & Mock 1980)，由式 (1)– 式 (4) 推演成時間的函數關係，供說明生長過程植株生理機制的調節作用 (Tei *et al*. 1996; Shimizu *et al*. 2008; Weraduwage *et al*. 2015; Fraile-Robayo *et al*. 2017)。上述依據 RGR 及 RLR 建構生物量和葉面積生長模式的過程，如何選擇動態趨勢函數 $f_w(t)$ 與 $f_A(t)$ 是影響生長模式可靠性之關鍵 (Pommerening & Muszta 2015)，眾多影響植株生長速率的因素造成 RGR 和 RLR 的計算偏差 (Hoffmann & Poorter 2002)，並影響選擇 $f_w(t)$ 與 $f_A(t)$ 的適用性。Rees *et al*. (2010) 指出 RGR 顯著受植株大小的變異性所影響，並提出以葉面積和葉乾重的回歸校正模式，Gibert *et al*. (2016) 就以總合分析 (meta analysis) 討論植株個體發育階段 (ontogenetic stage) 不同形態和生理特徵對生長速率的影響，而 Gent (2017) 在溫室萵苣的試驗研究強調，RGR 與日照、氣溫、根溫和養分濃度等環境因子顯著相關。因此，選擇不同 RGR 及 RLR 的動態趨勢函數對建構作物生長模式之差異性和適用情境，是必須仔細比較和深入探討的議題。

目前，探討改善結球萵苣生長模式的應用性與優化模式參數的相關研究仍不斷被提出，Moriyuki *et al*. (2018) 為擴充生長模式在萵苣生產管理的應用性，提出將收益模式導入生長模式的計算模組以回饋調校最佳化的生產管理參數；Chen *et al*. (2019) 考慮日照輻射和氣溫為影響葉球 (leafy head) 產量的主效因子，以累積日輻射量和日均溫為自變量，經線性回歸 (linear regression) 建構經驗型結球萵苣的產

量模式；Carini *et al*. (2020a, 2020b) 以不同類型模式套配萵苣產量試驗資料，依據模式化參數的差異，比較說明不同品種和產期的產量差異，並加以討論不同模式的適用性；Breure *et al*. (2021) 考慮土壤性質的空間變異造成田間萵苣植株的生長差異，以線性和線性混合 (linear-mixed) 模式導入土壤性質的空間變異性，建構萵苣葉球的生長模式。至今，仍較少研究以植株生理調節機制為基礎 (Bindraban 1999; Boote *et al*. 2001; Yin *et al*. 2003; Boote *et al*. 2013)，提出優化模式參數的估算和提升萵苣產量預測的準確度；因為作物生產收益來自有經濟價值的收穫部位，並非光合產物總量愈多就愈有利於生產收益，以作物生產管理為目標建構的生長模式，必須考慮最佳化的光合產物分配調節才能有效改善生產收益的評估效果 (Asseng *et al*. 2017; Fraile-Robayo *et al*. 2017)。

於前期研究中 (Chen *et al*. 2021)，本團隊已針對台灣結球萵苣的代表性田間生產系統，以生長分析和模式化評估說明結球萵苣的生長變異與季節性溫度變化的關聯，並指出外葉為光合產物的主要供源 (source)，而內葉捲曲生長並累積生物量形成葉球是光合產物分配的主要積儲 (sink)。本研究仍依結球萵苣的結球生理特性為基礎假設 (Scaife 1973; Liao *et al*. 1993; Jenni & Yan 2009)，將地上部生物量 (乾重) 的 RGR 和外葉面積的 RLR 分別導入不同類型的動態趨勢函數 $f_W(t)$ 與 $f_A(t)$，藉以推演發展出地上部乾重和外葉面積的生長模式；並考慮季節性溫度變化和不同田區農地變異，提出可行的模式耦合程序，以期改善不同期作溫度差異和田區特定環境條件造成植株生長的模擬偏差。

材料與方法

試驗區與調查資料

本研究試驗區位於雲林縣二崙鄉和麥寮鄉，試驗田區地號在二崙鄉境內的油車段 427 號和公館段 382 號，以及麥寮鄉境內的山寮段 474 號和 550 號；油車段 427 號田區屬粘板岩老沖積土的二林系土壤，公館段 382 號田區屬粘板岩老沖積土的員林系土壤，山寮段 474 號和 550 號田區屬砂頁岩及粘板岩混合沖積土的下崙系和番薯厝系土壤。本研究分別於 2017 年和 2018 年在 427 號與 382 號田區各進行 1 期試驗，於 2017 年在 474 號和 550 號田區各進行 1 期試驗，共彙集 6 組試驗資料，試驗期程如表 1 所示。各組試驗期作間之氣象資料取自中央氣象局網站的觀測資料查詢系統 (https://e-service.cwb.gov.tw/Histo-

表 1. 彙集本研究 6 組結球萵苣試驗資料之試驗區 (427、382、474 及 550 號)、栽培日程及溫度指標。

Table 1. Summary of experimental sites (No. 427, 382, 474 and 550), cultivation dates, and temperature indexes for 6 datasets of iceberg lettuce used in the study.

		Date (yr/mo/d)		Temperature (℃)			
Dataset	Site (No.)	Transplanting	Harvest	T_{mf} [z]	T_{ml} [y]	T_m [x]	T-index [w]
Modeling							
M1	382	2017/02/06	2017/03/29	16.1	19.9	17.9	21.7
M2	474	2017/11/13	2018/01/04	21.5	17.5	18.9	14.8
M3	427	2017/12/06	2018/02/02	16.6	16.0	16.5	15.9
M4	550	2017/12/16	2018/02/13	16.8	13.0	15.8	12.0
Validation							
V1	427	2017/01/27	2017/03/21	17.2	19.4	17.6	19.8
V2	382	2018/01/19	2018/03/15	16.4	19.5	16.9	21.0

[z] Mean temperature of the first 2 wk after transplanting.
[y] Mean temperature of the last 2 wk before harvest.
[x] Mean temperature of the period from transplanting to harvest.
[w] T-index = $T_m + (T_{ml} - T_{mf})$.

ryDataQuery/index.jsp)，經查閱下載雲林縣二崙測站 (23.4067°N, 120.4089°E) 和崙背測站 (23.7555°N, 120.3189°E) 的月平均、最高和最低溫度及累積降雨量紀錄，再與嘉義市嘉義測站 (23.4959°N, 120.4329°E) 的月累積日照時數紀錄，彙整如圖 1。各試驗區栽種結球萵苣品種皆為「常利 6 號」，種子來源為合歡農產有限公司。萵苣植株的生長紀錄項目包括：葉數、葉面積和植株各部位 (根、莖、葉) 之乾、鮮重，於定植後約每 7–10 天 (d) 從各田區隨機採集 5–6 棵植株 (plt)，量測記錄各項目。於可明確分辨葉球之定植後天數 (days after transplanting; DAT)，分開記錄展開外葉面積和葉球捲曲內葉面積，將田間採集之樣本植株由最外葉依序剝下，至葉片開始互相交疊、葉片中肋向植株中心軸彎曲且葉面未完全展開者，視為葉球捲曲內葉。再將植株依序取下的每一葉片平攤置於桌上型葉面積分析儀 (LI-3100C, LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA)，經掃描量測出葉面積；捲曲內葉無法攤平者，先行以解剖刀自葉柄處延中肋葉脈切開，使葉面能平鋪掃描面板以利量測面積。

本研究對各田區結球萵苣的生長分析和模式化評估使用之生育調查資料，參考行政院農業委員會農業試驗所執行 2017–2018 年科技計畫 (106 農科 -18.1.6- 農 -C1、107 農科 -14.2.6- 農 -C1) 已公開之研究報告，並與計畫執行單位之研究人員合作執行原始資料的彙整分析，將計畫相關細部紀錄引述於本研究中，為供讀者可便於確認和沿用本研究開發之模式參數，將上述 6 組試驗資料的植株生長曲線紀錄數據列表於附錄 1 和附錄 2。

作物生長模式

本研究依式 (1) 和式 (2) 定義，導入光合產物分配的生理調節機制，將結球萵苣生長過程累積增加的外葉面積和地上部乾重分別對應為光合產物的主要供源和積儲，且參酌多數研究報告提出之共通建議 (Tei *et al*. 1996; Shimizu *et al*. 2008; Fraile-Robayo *et al*. 2017; Carini *et al*. 2020a, 2020b)：萵苣生長曲線的特徵是初期生長速率較慢，之後會逐漸遞增且顯著加快再緩慢遞減，近似 S 形曲線 (sigmoid curve)。因此，提出以下描述 RLR 和 RGR 變動趨勢的 3 種時間函數 $f(t)_{LIN}$、$f(t)_{GOP}$ 和 $f(t)_{LOG}$：

$$f(t)_{LIN} = a - bt \text{、} \quad (5)$$

$$f(t)_{GOP} = a \exp(-bt) \quad (6)$$

和

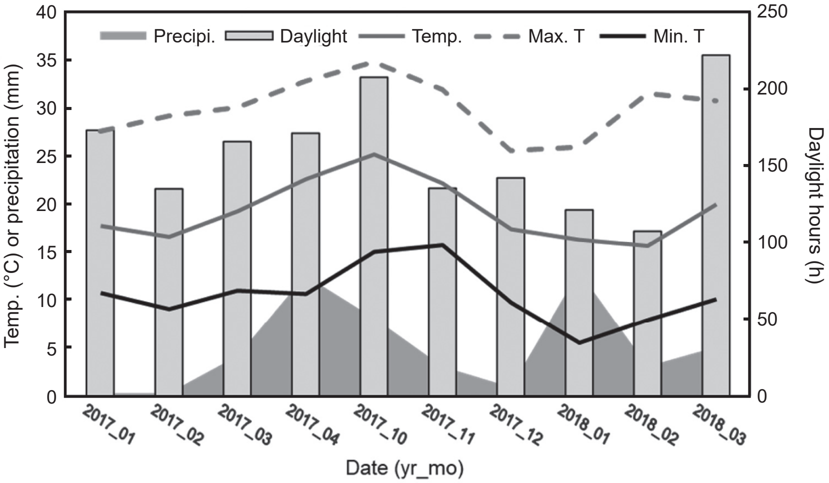

圖 1. 結球萵苣試驗資料的生長期間每月之平均溫度、日照時數和累積降雨量。

Fig. 1. Monthly average temperature, daylight hours, and accumulated precipitation during the growth periods for the experimental datasets of iceberg lettuce.

$$f(t)_{LOG} = b\{a - \exp[F(t)]\} \text{，} \quad (7)$$

其中參數 a 和 b 與主導 RLR 或 RGR 變動趨勢的生理調節機制有關，受氣候因素或系統性栽培條件所影響，F(t) 代表對數化生長模式：葉面積 ln[A(t)] 或乾重 ln[w(t)]。依式 (3) 和式 (4) 之定義，分別代入式 (5)、式 (6) 和式 (7)，對應積分式求解如下：

$$F(t)_{LIN} = (-b/2)t^2 + at + c \text{ 、} \quad (8)$$

$$F(t)_{GOP} = (-a/b) \cdot \exp(-bt) + c \quad (9)$$

和

$$F(t)_{LOG} = \ln\{a/[1 + \exp(-c) \cdot \exp(-bt)]\} \text{，} \quad (10)$$

其中參數 c 為積分式的邊界條件，與各試驗區的特定環境條件有關，可由試驗資料套配模式的外插截距求得。

上述式 (9) 和式 (10) 分別稱為 Gopertz (GOP) 和 Logistic (LOG) 模式，兩者皆為 S 形曲線，是目前最常被應用的生長模式 (Zeide 1993)；LOG 模式為自催化反應 (autocatalytic reaction) 函數，反曲點左右對稱；GOP 模式曲線的反曲點左右不對稱，左端斜率遞增速率比右端遞減速率快 (Amer & Williams 1957; Richards 1959)；式 (8) 稱為二次線性模式 (LIN)，針對 RLR 或 RGR 變動趨勢缺乏相關理論機制，或試驗資料的生長曲線形態特殊時，是可廣泛通用的模式類型，也是建構簡易經驗型模式為目標的優先選擇 (附錄 3)。

模式耦合的程序設計

本研究考慮現行台灣結球萵苣生產系統的環境變因和栽培條件，可將植株生長變異歸因於季節性的溫度變化和不同田區栽培管理的農地變異，依式 (8)、式 (9) 和式 (10)，假設參數 a 和 b 與栽培期間的溫度變化有關，而參數 c 代表各田區農地管理差異影響植株生長的反應基線 (baseline)。參數 a 和 b 可分別以溫度指標 (T-index; T) 的線性函數 a(T) 和 b(T) 表示如下：

$$a(T) = \alpha_a + \beta_a T + \gamma_a T^2 \quad (11)$$

和

$$b(T) = \alpha_b + \beta_b T + \gamma_b T^2 \text{，} \quad (12)$$

其中各項係數 α_a、β_a、γ_a 和 α_b、β_b、γ_b 的估算，可由 4 組模式化試驗資料套配生長模式 [式 (8)、式 (9) 和式 (10)] 所估算的參數 a 和 b (表 2)，對應各組資料的溫度指標 T-index (表 1)，以線性回歸分析求出各項係數。選取特定田區 (S) 將其試驗期間的 T-index = Ts 代入式 (11) 和式 (12)，計算出 a(Ts) 和 b(Ts)，即為考慮季節性溫度變化的耦合參數 $a' = a(Ts)$ 和 $b' = b(Ts)$。

參數 c 的耦合模擬是依 3 種模式類型 [式 (8)、式 (9) 和式 (10)] 將 a' 和 b' 代入，使代表田區 S 的耦合模擬函數可改寫如下：

$$F_S(t|a', b')_{LIN} = (-b'/2)t^2 + a' t + c \text{、} \quad (13)$$

$$F_S(t|a', b')_{GOP} = (-a'/b') \cdot \exp(-b' t) + c \quad (14)$$

和

$$\ln[O_S/(a' - O_S)] = a' b' t + c \text{，} \quad (15)$$

其中 $O_S = \exp[F_S(t|a', b')_{LOG}]$。下一步，將田區 S 的葉面積或乾重生長紀錄資料對數化 $\{\ln[w_S(t_i)]$ 或 $\ln[A_S(t_i)]\}$，並以 $L_S(t_i)$ 表示，對應式 (13)、式 (14) 和式 (15) 左側的 $F_S(t \mid a', b')$ 項代入 $L_S(t_i)$，依 3 種模式可分別計算生長曲線的每個紀錄時間點 t_i 對應的參數 c_i，表示如下：

$$c_{i\,LIN} = L_S(t_i) - [(-b'/2)t_i^2 + a' t_i)] \text{ 、} \quad (13a)$$

$$c_{i\,GOP} = L_S(t_i) - [(-a'/b') \cdot \exp(-b' t_i)] \quad (14a)$$

和

$$c_{i\,LOG} = \ln\{O_S(t_i)/[a' - O_S(t_i)]\} - a' b' t_i \text{，} \quad (15a)$$

表 2. 以 4 組結球萵苣的生長曲線資料 (附錄 1) 分別套配線性 (LIN)、Gopertz (GOP) 和 Logistic (LOG) 模式推估之參數 *a* 和 *b*，供決定相對生長率 (RGR) 和相對葉生長率 (RLR) 的時間函數 f(t)。

Table 2. Estimated values of parameters *a* and *b* by fitting linear (LIN), Gopertz (GOP) and Logistic (LOG) models with 4 datasets of iceberg lettuce's growth curves (Appendix 1), respectively, and determinations of relative growth rate (RGR) and relative leaf-growth rate (RLR) in functions of time f(t).

	RLR and RGR in functions of time f(t): model types and parameters							
		LIN[z]		GOP[y]		LOG[x]		
Dataset and site	f(t)	*a*	*b*	*a*	*b*	*a*	*b*	*a* × *b*
M1_382	RLR	0.2029	0.0028	0.2203	0.0208	6693.500	2.639×10^{-5}	0.17664
	RGR	0.1695	0.0016	0.1699	0.0113	49.579	3.078×10^{-3}	0.15260
M2_474	RLR	0.2119	0.0044	0.3624	0.0576	3000.000	4.098×10^{-5}	0.12294
	RGR	0.2087	0.0036	0.2792	0.0356	56.000	1.702×10^{-3}	0.09531
M3_427	RLR	0.2155	0.0039	0.2629	0.0390	2695.400	3.869×10^{-5}	0.10429
	RGR	0.2068	0.0032	0.3246	0.0372	28.236	4.676×10^{-3}	0.13203
M4_550	RLR	0.1960	0.0032	0.2302	0.0317	8338.000	9.049×10^{-6}	0.07545
	RGR	0.2280	0.0034	0.3623	0.0368	46.314	2.345×10^{-3}	0.10861

[z] $f(t)_{LIN} = a - bt$.
[y] $f(t)_{GOP} = a \exp(-bt)$.
[x] $f(t)_{LOG} = b[a - \exp(F)]$, where $F = \int f(t)dt$.

其中 $O_S(t_i) = \exp[L_S(t_i)]$，而 c_i 表示生長曲線各紀錄時間點植株生長表現的田區基線 (baseline)，本研究以其累加平均計算出耦合參數 c'，以代表該組試驗資料受田區內農地變異影響的指標參數：

$$c' = (\Sigma c_i)/n，\quad (16)$$

其中 *n* 為生長曲線的紀錄點數；將對應 3 種模式的 c' 分別代入式 (13)、式 (14) 和式 (15) 的右側參數 c 項，即可完成 3 種模式代表田區 S 專一性的耦合模擬函數：$F_S(t|a', b', c')_{LIN}$、$F_S(t|a', b', c')_{GOP}$ 和 $F_S(t|a', b', c')_{LOG}$。

模式化與驗證流程

本研究提出以模式耦合溫度變化與農地變異模擬結球萵苣生長之程序，步驟如圖 2 所示，並依據表 1 所列，將 6 組結球萵苣生產試驗資料分為模式化 (modeling) 和驗證 (validation) 兩部分，4 組資料 (M1_382、M2_474、M3_427 和 M4_550) 用於模式化步驟，2 組資料 (V1_427 和 V2_382) 用於驗證步驟。步驟 1 和 2 (Steps 1 & 2)：以 3 種類型之時間函數 [式 (5)、式 (6) 和式 (7)] 導入生長分析的核心指標 RGR 與 RLR，依定義分別推導出微分方程式的解析解 [式 (8)、式 (9) 和式 (10)]，即為 LIN、GOP 和 LOG 等 3 種模式。步驟 3 和 4 (Steps 3 & 4)：以 4 組模式化資料分別套配 3 種模式求出參數 *a*、*b* 和 *c*，參數 *a* 和 *b* 可供生長分析說明 RGR 和 RLR 的動態變化。步驟 5 和 6 (Steps 5 & 6)：將 4 組模式化資料的參數 *a* 和 *b* 對應 T-index (T) 的線性函數關係 *a*(T) 和 *b*(T) [式 (11) 和式 (12)]，以線性迴歸求出各項係數，供耦合模擬不同溫度下 RGR 和 RLR 的動態變化。步驟 7 和 8 (Steps 7 & 8)：將已知試驗田區 S 的 T-index = Ts 代入式 (11) 和式 (12)，估算出耦合參數 a' 和 b'，併同對數化試驗資料 $\ln[w_S(t_i)]$ 或 $\ln[A_S(t_i)]$ 導入耦合模擬函數 [如式 (13a)、式 (14a) 和式 (15a)]，再依式 (16) 計算出耦合參數 c'。

最後，為確認上述模式化步驟的可行性及耦合模擬程序之有效性，本研究以田區 427 號和 382 號的 2 組不同來源資料 (V1_427 和 V2_382) 進行驗證，依上述步驟 7 和 8，建構 3 種模式類型的耦合生長模擬函數 $F_{V1_427}(t|a', b', c')$ 和 $F_{V2_382}(t|a', b', c')$，並以平均絕對誤差 (mean absolute error; MAE) 和均方差 (mean squared

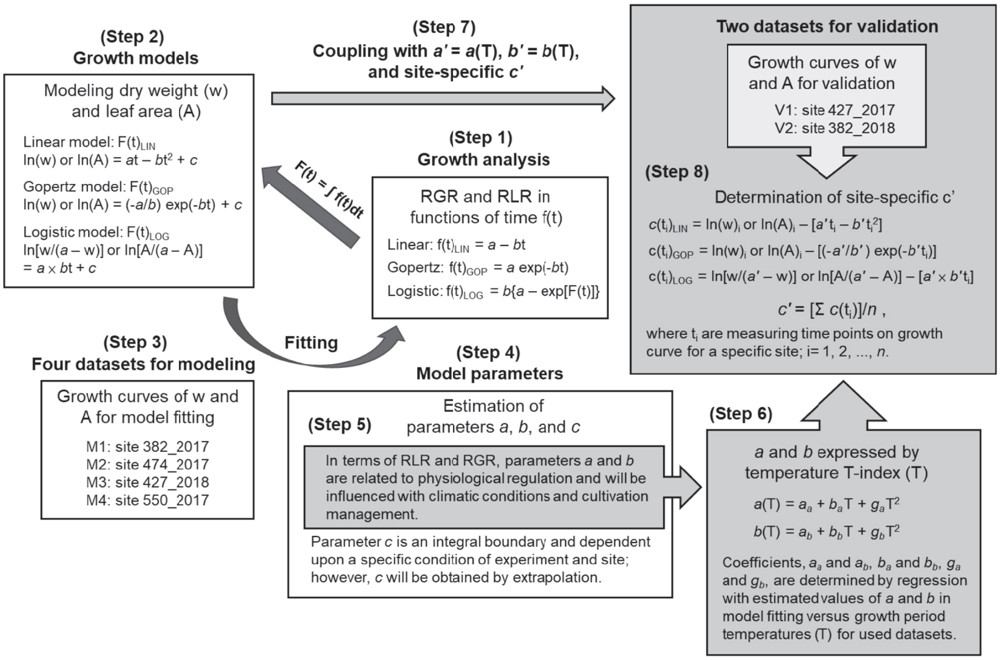

圖 2. 結球萵苣的生長分析與不同模式耦合溫度變化和田區變異之模式化及驗證程序。

Fig. 2. Procedures of modeling and validation for growth analysis of iceberg lettuce and use of different models coupling with temporal changes and farmland variation.

error; MSE)，供比較不同模式的耦合模擬預測準確度 (Walther & Moore 2005)：

$$MAE = 1/n \cdot \Sigma|F_s(t_i|a', b', c') - L_S(t_i)| \quad (17)$$

和

$$MSE = 1/n \cdot \Sigma[F_s(t_i|a', b', c') - L_S(t_i)]^2 , \quad (18)$$

其中 t_i 是生長曲線的紀錄時間點，$F_S(t_i|a', b', c')$ 是模擬預測值，$L_S(t_i)$ 是生長紀錄的對數化觀測值 $\ln[w_S(t_i)]$ 或 $\ln[A_S(t_i)]$；並以小樣本修正的赤池資訊量準則 (Akaike information criterion; AIC_C) 為耦合模擬的適配性 (goodness-of-fit) 指標 (Hurvich and Tsai 1989; Rossi *et al.* 2020)：

$$AIC_C = [n \cdot \ln(MSE) + 2k] + 2k \cdot (k + 1)/(n - k - 1) , \quad (19)$$

其中依驗證資料 V1_427 和 V2_382 的生長紀錄值個數設定 $n = 5$，且因各模式類型耦合皆有 a'、b' 和 c' 等 3 個參數，設定 $k = 3$。

結果與討論

生長曲線的模式套配

圖 3 為結球萵苣單株外葉面積對數化觀測值與模式套配曲線，各組資料套配 LIN、GOP 和 LOG 模式的決定係數 $r^2 > 0.94$ 且顯著水準 $P < 0.005$，顯示 3 種模式的套配曲線皆可有效評估試驗期間內 (DAT < 60) 結球萵苣外葉面積的生長變異。然而，相較 LIN 和 GOP 模式，亦可發現生長初期 (DAT < 30) LOG 模式的套配曲線明顯偏離第 1 點觀測值，而且 3 種模式外插至 DAT = 0 的截距差異明顯，尤其在 M2_474、M3_427 和 M4_550 等組資料的截距差異性甚大。圖 4 為結球萵苣地上部乾重對數化觀測值與模式套配曲線，各組資料套配 3 種模式的 $r^2 > 0.91$ 且顯著水準 $P < 0.005$，顯示

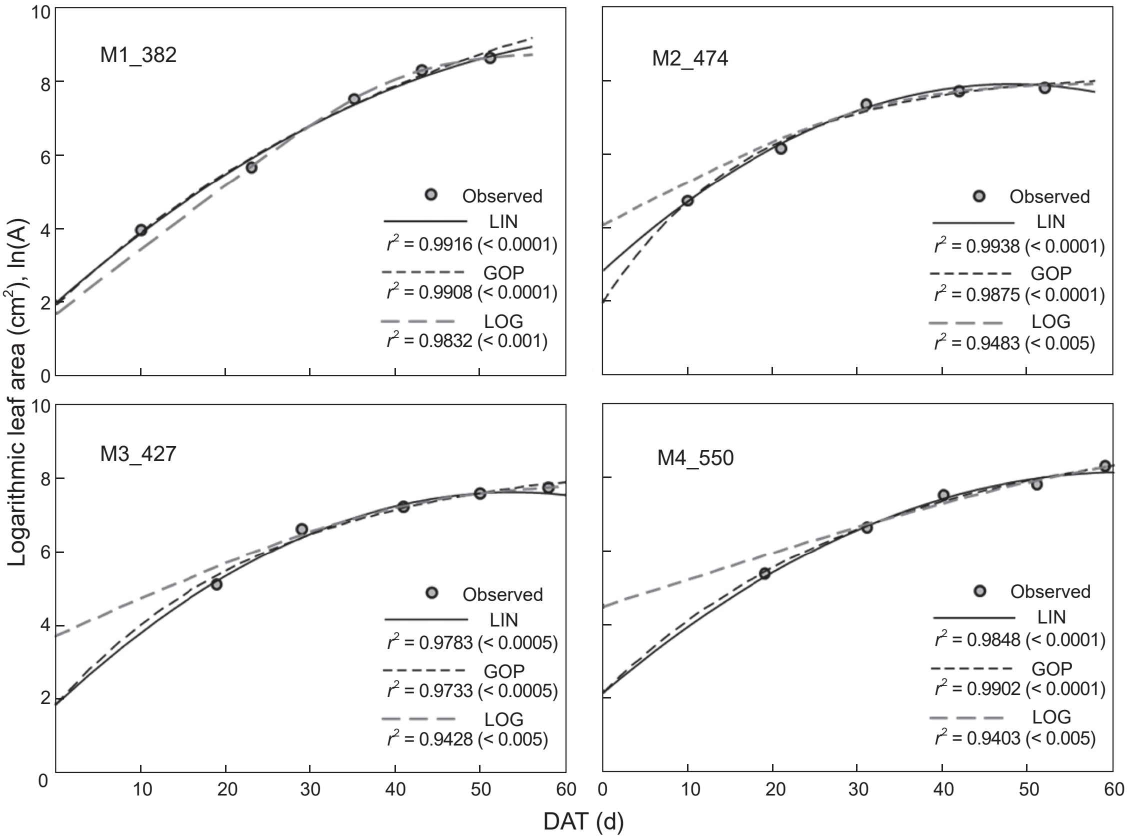

圖 3. 各組試驗 (M1_382、M2_474、M3_427 及 M4_550) 之結球萵苣單株外葉面積 (cm^2 plt^{-1}) 的對數化資料及 3 種模式的套配曲線：線性 (LIN)、Gopertz (GOP) 和 Logistic (LOG)。r^2 表示決定係數，括弧內數值表示顯著水準。

Fig. 3. Logarithmic values of iceberg lettuce's outer leaf area (cm^2 plt^{-1}) in the datasets (M1_382, M2_474, M3_427 and M4_550) and the fitting curves of 3 models: linear (LIN), Gopertz (GOP), and Logistic (LOG). r^2 denotes coefficient of determination and the significant level is denoted in parentheses.

各模式的套配曲線可有效描述試驗期間結球萵苣地上部乾重的生長變異；由 r^2 的差異比較得知，不同模式對各組資料的適配性差異明顯，雖然 3 種模式對資料 M1_382 和 M3_427 的適配性相近，且套配曲線與觀測值的吻合度極高，但 LOG 模式對資料 M2_474 和 M4_550 的適配性卻明顯偏低，此結果與 LOG 模式套配外葉面積生長資料的適配性較差趨勢一致 (圖 3)。

Tei *et al*. (1996) 在早期的研究已指出LIN、GOP 和 LOG 等 3 種模式，皆可適用於描述田間栽培萵苣的生長曲線，而且 GOP 模式的適配性最佳，而且 LIN 模式更適合於模擬初期生長快速的階段 (Scaife 1973)。Carini *et al*. (2019, 2020b) 指出 GOP 和 LOG 模式對溫室水耕萵苣的生長曲線適配性良好，LOG 模式對萵苣植株的生長變異有最佳描述，LOG 模式也被優先推薦應用於土耕栽培萵苣的生長模擬 (Carini *et al*. 2020a)。由圖 3 和圖 4 的結果得知，以 3 種模式描述結球萵苣外葉面積和地上部乾重的生長曲線皆具適用性，但各組資料來源的產期氣候條件及所在田區之環境差異明顯 (表 1、圖 1)，亦可能影響 3 種模式的適配性。依 S 形生長模式先慢後快再慢的形狀特徵 (Brisbin *et al*. 1987)，各組資料紀錄的生育期是結球萵苣營養生長期的前半階段，與 3 種模

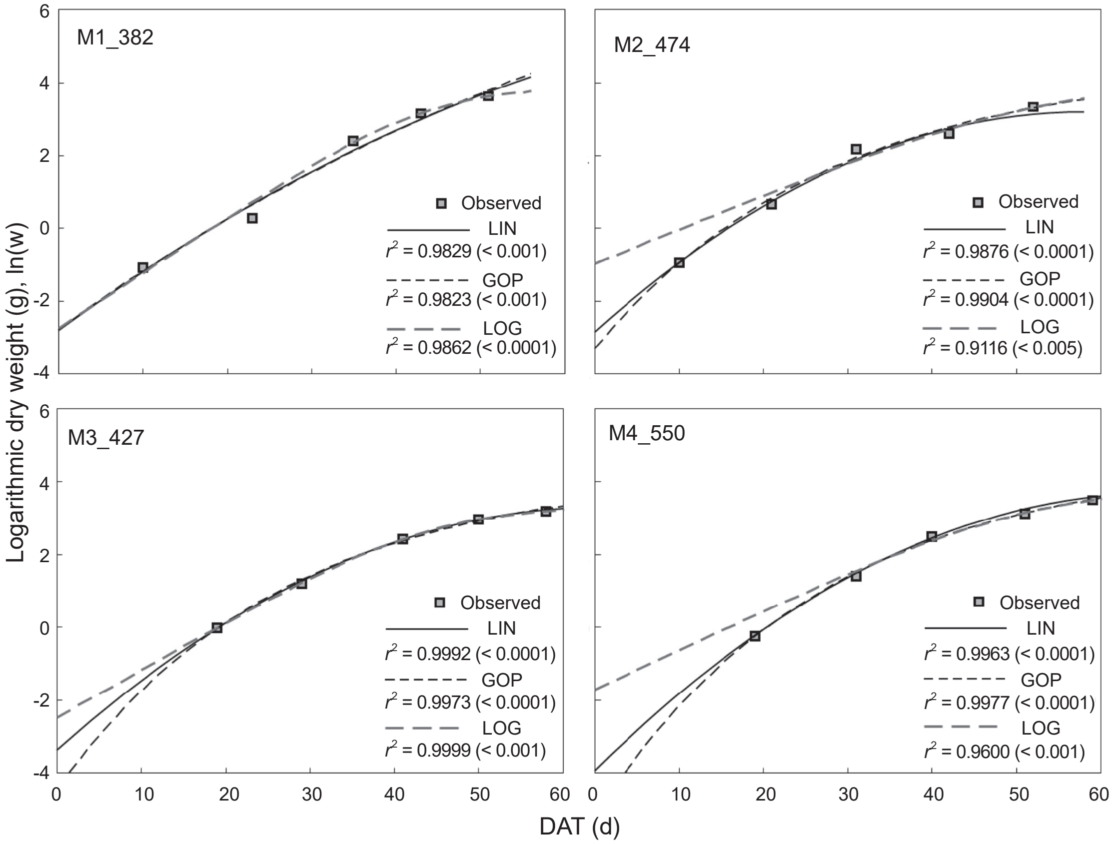

圖 4. 各組試驗 (M1_382、M2_474、M3_427 及 M4_550) 之結球萵苣單株地上部乾重 (g plt^{-1}) 的對數化資料及 3 種模式的套配曲線：線性 (LIN)、Gopertz (GOP) 和 Logistic (LOG)。r^2 表示決定係數，括弧內數值表示顯著水準。

Fig. 4. Logarithmic values of iceberg lettuce's shoot dry weight (g plt^{-1}) in the datasets (M1_382, M2_474, M3_427 and M4_550) and the fitting curves of 3 models: linear (LIN), Gopertz (GOP), and Logistic (LOG). r^2 denotes coefficient of determination and the significant level is denoted in parentheses.

式前半段的形狀特徵相符，所以 3 種模式可普遍適用於套配結球萵苣的生長曲線，然而先慢後快的斜率遞增趨勢以 GOP 模式的遞增速率最快，LIN 模式其次，LOG 模式的斜率遞增較緩 (Winsor 1932; Richards 1959; Cao *et al*. 2019)，不同模式特徵差異與各組資料特性的情境比對是影響模式適配性之關鍵。若由各組資料來源的季節性溫度變化 (圖 1) 和 T-index (表 1) 發現，M1_382 生育期溫度先低後高，可預期生育前段 (DAT < 30) 生長速率遞增較慢，較適合套配 LOG 模式，而 M2_474 和 M4_550 生育期溫度先高後低，可預期生育前段 (DAT < 30) 生長速率遞增較快，較適合套配 LIN 和 GOP 模式；因此生育期間不同階段紀錄資料的情境分析 (scenario analysis)，也可提供選擇最佳模式類型的參考依據。

生長模式參數與 RGR 和 RLR 生長分析

表 2 為各組資料外葉面積和地上部乾重套配 3 種模式估算的參數 *a* 和 *b*，LIN 模式的參數 *a* 介於 0.1695–0.2280，而參數 *b* 介於 0.0016–0.0044，M1_382、M2_474 和 M3_427 等組的外葉面積參數 *a* 和 *b* 皆分別大於地上部乾重參數 *a* 和 *b*，而 M4_550 的外葉面積參數 *a* 和 *b* 分別小於地上部乾重參數 *a* 和 *b*；GOP 模式的參數 *a* 介於 0.1699–0.3624，參數 *b* 介

於 0.0113–0.0576，組別 M1_382 和 M2_474 的外葉面積參數 *a* 和 *b* 皆大於地上部乾重參數 *a* 和 *b*，但 M3_427 和 M4_550 的外葉面積參數 *a* 和 *b* 卻小於地上部乾重參數 *a* 和 *b*；LOG 模式的參數乘積 ($a \times b$) 介於 0.07545–0.17664，也可發現組別 M1_382 和 M2_474 的外葉面積參數 $a \times b$ 皆大於地上部乾重參數 $a \times b$，但 M3_427 和 M4_550 的外葉面積參數 $a \times b$ 卻小於地上部乾重參數 $a \times b$。以上不同組別資料的 3 種模式參數 *a*、*b* 或 $a \times b$ 的差異，可能與表 1 所示各組資料的生育期間平均溫度 (T_m) 和溫度指標 (T-index) 有關，其中組別 M1_382 與 M2_474 的 T_m 和 T-index 較高，M4_550 的 T-index 明顯偏低，而 M3_427 的溫度及變化居中，經比對可發現 T_m 或 T-index 較高的組別資料，呈現外葉面積參數 *a* 和 *b* 大於地上部乾重參數 *a* 和 *b* 的傾向。

依據式 (5)、式 (6) 和式 (7)，代入參數 *a* 和 *b* 即可說明結球萵苣於生育期間 RGR 和 RLR 的變動趨勢，對於 LIN 和 GOP 模式，參數 *a* 代表定植日 (DAT = 0) 的起始 RGR 或 RLR，而 LOG 模式的起始 RGR 或 RLR 則是參數 $a \times b$，而 3 種模式的參數 *b* 表示 RGR 或 RLR 隨植株生長的速率遞減指標 (Madariaga & Knott 1951; Chen *et al*. 2021)。若參數 *a* 和 *b* 受溫度變化所影響，外葉面積參數 *a* 大於地上部乾重參數 *a*，植株生長前期的生理狀態趨向 RLR 大於 RGR，而且外葉面積參數 *b* 也大於地上部乾重參數 *b*，則 RLR 的遞減速率大於 RGR，至生長後期可能 RGR 大於 RLR，如此外葉面積比 (LAR) 傾向遞減而淨同化率 (NAR) 會遞增，將有利加速累積光合產物；例如組別 M1_382 和 M2_474，屬於 T_m 和 T-index 較高者。相反，若外葉面積參數 *a* 小於地上部乾重參數 *a*，植株生長前期趨向 RLR 小於 RGR，而且外葉面積參數 *b* 也小於地上部乾重參數 *b*，RLR 的遞減速率小於 RGR，將促使 LAR 遞增而 NAR 可能會遞減，致使光合產物的累積速率減緩；例如 M4_550 的 T_m 和 T-index 皆較低者。為提升模式適配性及不同氣候特性或栽培條件的廣泛適用性，已有許多研究提出以生長積溫日數 (growth degree days; GDD) 取代定植後天數 (DAT)，以套配 GDD 函數的生長模式可更完整解釋萵苣的生長變化並精準模擬生長過程 (Scaife *et al*. 1987; Tei *et al*. 1996; Carini *et al*. 2020a, 2020b)。

溫度變化的模式耦合

圖 5 所示為各組資料套配 LIN 和 GOP 模式的參數 *a* 和 LOG 模式的參數 $a \times b$ (表 2) 對應 T-index (表 1) 之關係，LIN 模式的參數 *a* 對應 T-index 呈直線緩慢遞減 (圖 5A)，GOP 模式的參數 *a* 對應 T-index 呈通過高點的遞減曲線 (圖 5B)，LOG 模式的參數 $a \times b$ 對應 T-index 呈直線遞增 (圖 5C)。圖 6 則是 3 種模式參數 *b* 對應 T-index 之關係，外葉面積與地上部乾重資料套配同型模式的參數 *b* 對應 T-index 的變動趨勢相近，皆呈現遞增再遞減的趨勢。換言之，決定 RGR 和 RLR 之變動趨勢函數 $f_w(t)$ 與 $f_A(t)$ 的參數 *a* 和 *b* 受溫度影響程度相似且趨勢相近，顯示外葉面積和地上部乾重的生長變異具高度關聯性，這結果也可佐證，本研究假設結球萵苣植株外葉與內部葉球分別為主要供源和積儲之合理性。

依本研究提出的模式耦合程序 (圖 2)，其中步驟 5 和 6 將式 (11) 和式 (12) 分別套入參數 *a* 和 *b* 對應 T-index 的關係圖形 (圖 5 和圖 6)，所得之溫度耦合方程式 *a*(T) 和 *b*(T) 可用於估算耦合參數 a' 和 b'，由 *a*(T) 和 *b*(T) 的決定係數 (r^2) 得知 a' 和 b' 受溫度效應的影響程度約 40–80%，耦合溫度效應的程序仍可在有限效度的標準下估算出參數 a' 和 b'；但部分 r^2 的顯著水準未達 $P < 0.1$，以步驟 5 和 6 估算耦合參數 a' 和 b' 的偏差與變異性，仍有待後續的研究探討與改進。Wang (1960) 就指出早在 18 世紀初科學家已發現生長過程的特定階段與溫度直接相關，而且以日均溫度總和可預測生長變化的過程；至今，基於溫度效應探討植物生長及發育過程，並藉以預測生長速率的研究概念，仍廣泛被應用於作物栽培技術和生態資源保育的研究 (Grace 1988; Ritchie & NeSmith 1991; Hatfield & Prueger 2015)。

農地變異的模式耦合與驗證

本研究依模式耦合程序的步驟 7 和 8 (圖

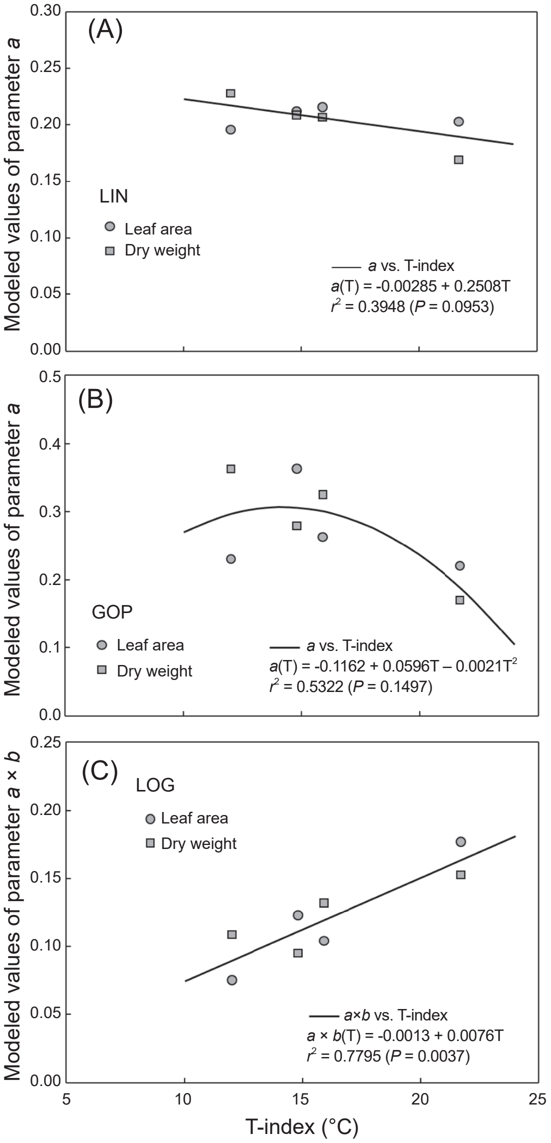

圖 5. 各組試驗資料 (M1_382、M2_474、M3_427 及 M4_550) 的對數化結球萵苣外葉面積及地上部乾重，分別被套配 (A) 線性 (LIN)、(B) Gopertz (GOP) 及 (C) Logistic (LOG) 等模式取得參數 *a* 和 *a* × *b* 以對應各組溫度指標 (T-index) 之關係。r^2 表示決定係數，括弧內 *P* 值表示顯著水準。

Fig. 5. Modeled values of parameters *a* and *a* × *b* in (A) linear (LIN), (B) Gopertz (GOP) and (C) Logistic (LOG) models fitting to logarithmic values of iceberg lettuce's outer leaf area and shoot dry weight being in relation to the temperature indexes (T-index) for the datasets (M1_382, M2_474, M3_427 and M4_550). r^2 denotes coefficient of determination and the significant level is denoted as *P* value in parentheses.

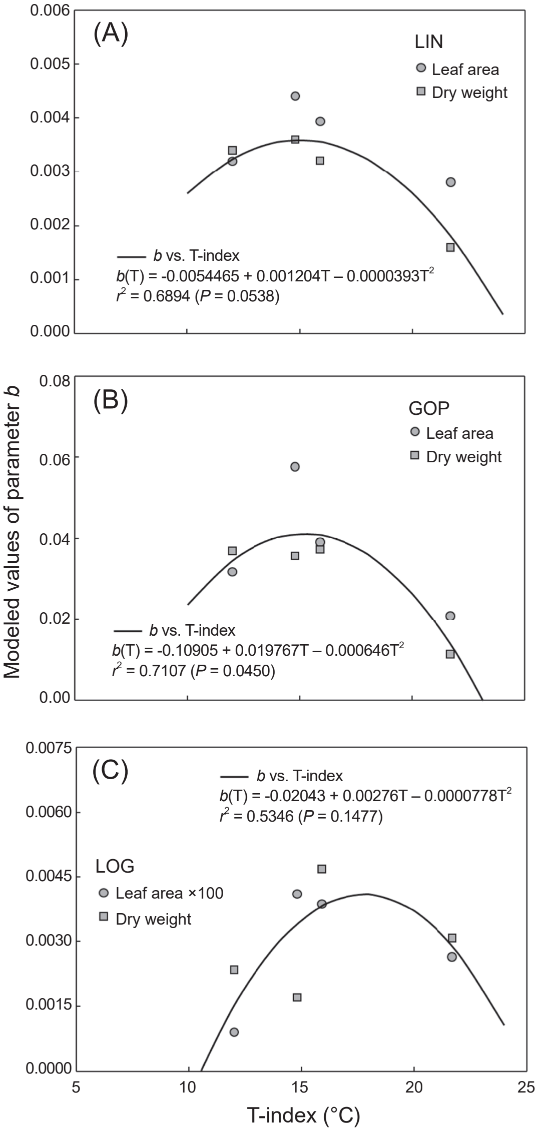

圖 6. 各組試驗資料 (M1_382、M2_474、M3_427 及 M4_550) 的對數化結球萵苣外葉面積及地上部乾重，分別被套配 (A) 線性 (LIN)、(B) Gopertz (GOP) 及 (C) Logistic (LOG) 等模式取得參數 *b* 以對應各組溫度指標 (T-index) 之關係。r^2 表示決定係數，括弧內 *P* 值表示顯著水準。

Fig. 6. Modeled values of parameter *b* in (A) linear (LIN), (B) Gopertz (GOP) and (C) Logistic (LOG) models fitting to logarithmic values of iceberg lettuce's outer leaf area and shoot dry weight being in relation to the temperature indexes (T-index) for the datasets (M1_382, M2_474, M3_427 and M4_550). r^2 denotes coefficient of determination and the significant level is denoted as *P* value in parentheses.

2)，將表 1 中供模式化的各組資料 (M1、M2、M3 和 M4) 的 T-index 代入 3 種模式的耦合方程式 a(T) 和 b(T) (圖 5 和圖 6)，計算出耦合參數 a' 和 b' (表 3)，再將 3 種模式的 a' 和 b' 分別代入式 (13a)、式 (14a) 和式 (15a)，推算出對應的耦合參數 c' (表 3)，可代表 M1、M2、M3 和 M4 各組資料內農地變異影響植株生長的反應基線。表 3 所示之耦合參數 a' 和 b' 是由 4 組模式化資料共同建構的溫度變化函數式 (11) 和式 (12) 計算求出，其表示植株生長受溫度變化影響的代表參數，可供計算植株受溫度變化影響的生長量 [式 (13)、式 (14) 和式 (15)]；而耦合參數 c' 是各組生長曲線資料的 5 個觀測值，扣除受溫度變化影響的生長量之殘差平均，也就各組資料所在田區農地變異影響生長的平均基準，耦合參數 c' 可能因田區位置不同或栽培管理方式改變而有顯著差異，依據式 (8)、式 (9) 和式 (10) 的 LIN、GOP 和 LOG 模式定義，將耦合參數 a'、b' 和 c' 代入，即可得出涵蓋耦合溫度變化及農地變異之生長模擬函數 $F_S(t|a', b', c')$，並可解釋各組資料的田區專一性 (site-specific)。圖 7A 和圖 7B 分別為外葉面積和地上部乾重的對數化耦合模擬估計值對應觀測值之散布圖，整體趨勢呈現估計值對應觀測值多集中分布於 1：1 對角線上，表示以 $F_S(t|a', b', c')$ 估算外葉面積和地上部乾重的準確度高，且 3 種模式的耦合模擬皆具適用性。然而，以 LIN 和 GOP 模式進行耦合模擬之外葉面積估計值，於植株生長前期明顯低估，但後期高估，而 LOG 模式的推估偏差則較小且無特定趨勢 (圖 8A)；3 種模式對地上部乾重的耦合模擬預測在初始生長皆明顯低估，但 LIN 和 GOP 模式於前期逐漸轉為高估，後期雖些微低估但偏差較小，LOG 模式於生長後期的部分推估值明顯偏低，皆為組別 M4_550 的資料，但其他組資料的推估值與觀測值吻合度極高 (圖 8B)。相較 LIN 和 GOP 模式，以 LOG 模式耦合模擬外葉面積和地上部乾重在生長後期的預測準確度較高，如此較有利於正確推算最適採收期與最終收穫產量，若以

表 3. 以 4 組結球萵苣的外葉面積 (A) 和地上部乾重 (w) 生長曲線資料 (附錄 1) 分別估算線性 (LIN)、Gopertz (GOP) 和 Logistic (LOG) 模式的耦合參數 a'、b' 和 c'。

Table 3. Parameters a', b', and c' estimated by coupling procedures for linear (LIN), Gopertz (GOP) and Logistic (LOG) models, respectively, with 4 datasets of iceberg lettuce's growth curves (Appendix 1) for outer leaf area (A) and shoot dry weight (w).

Dataset and site	Parameter obtained by coupling	Leaf area (A) $\ln(A) = F_S(t\|a', b', c')$			Dry weight (w) $\ln(w) = F_S(t\|a', b', c')$		
		LIN[z]	GOP[y]	LOG[x]	LIN	GOP	LOG
M1_382	a'	0.1890	0.1883	5665.4000	0.1890	0.1883	56.6540
	b'	1.804×10^{-3}	0.0138	2.89×10^{-5}	1.804×10^{-3}	0.0138	2.89×10^{-3}
	c'	1.8541	15.7280	-6.3596	-3.3092	10.5650	-7.2896
M2_474	a'	0.2086	0.3059	3252.0000	0.2086	0.3059	32.5200
	b'	3.598×10^{-3}	0.0411	3.42×10^{-5}	3.598×10^{-3}	0.0411	3.42×10^{-3}
	c'	2.4327	9.2623	-4.0217	-2.8000	4.0296	-6.3423
M3_427	a'	0.2055	0.3005	3120.8000	0.2055	0.3005	31.2080
	b'	3.568×10^{-3}	0.0409	3.83×10^{-5}	3.568×10^{-3}	0.0409	3.83×10^{-3}
	c'	1.8834	8.5832	-5.2353	-3.0205	3.6793	-5.5799
M4_550	a'	0.2166	0.2966	5909.1000	0.2166	0.2966	59.0910
	b'	3.568×10^{-3}	0.0346	1.52×10^{-5}	3.568×10^{-3}	0.0346	1.52×10^{-3}
	c'	1.4071	9.5815	-4.6552	-3.6996	4.4748	-5.3071

[z] $F_S(t|a', b', c')_{LIN} = (-b'/2)t^2 + a'\,t + c'$.
[y] $F_S(t|a', b', c')_{GOP} = (-a'/b')\exp(-b'\,t) + c'$.
[x] $F_S(t|a', b', c')_{LOG} = \ln\{a'/[1 + \exp(-c') \cdot \exp(-b'\,t)]\}$.

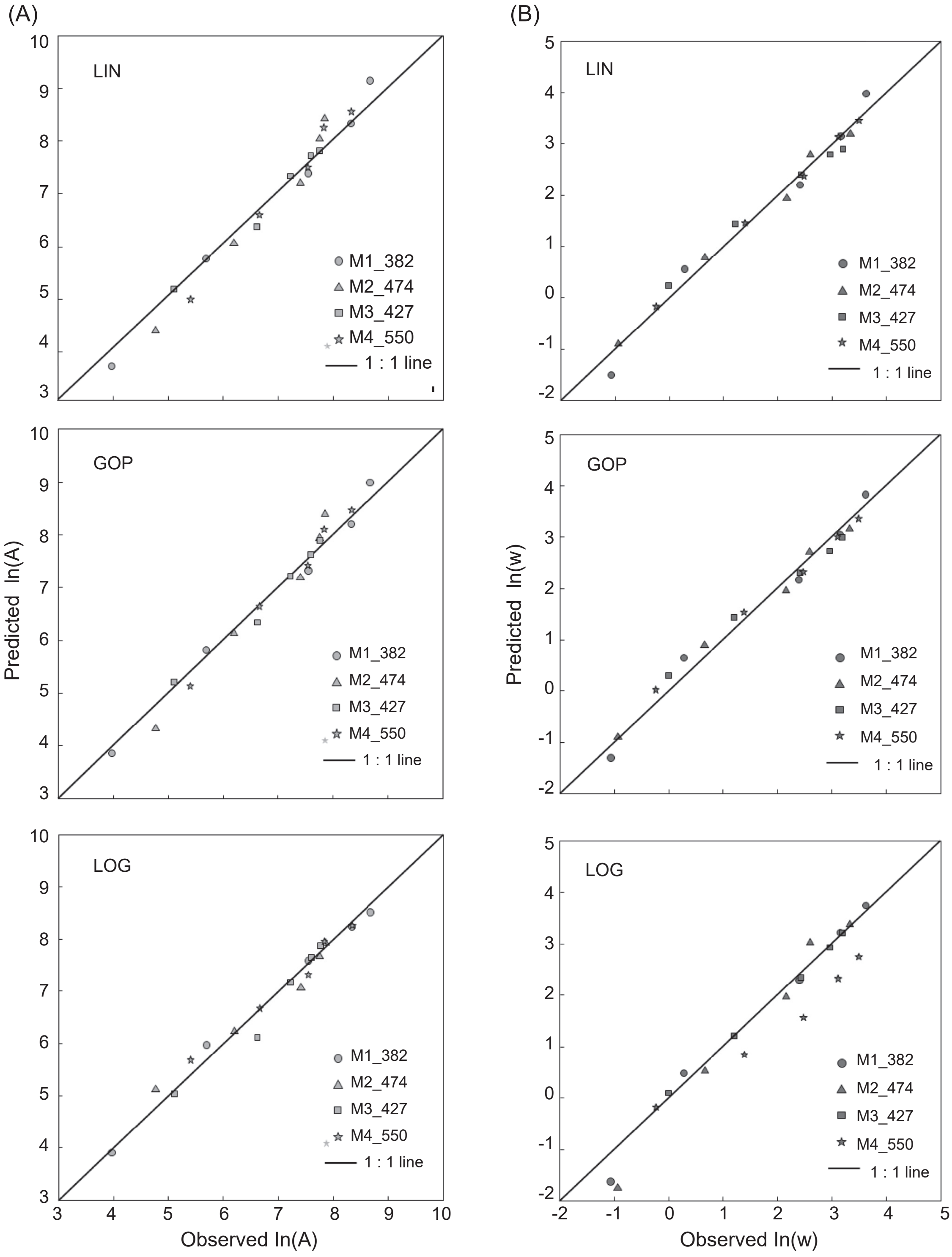

圖 7. 分別以線性 (LIN)、Gopertz (GOP) 及 Logistic (LOG) 模式的耦合模擬程序預測各組試驗資料 (M1_382、M2_474、M3_427 及 M4_550) 的對數化 (A) 結球萵苣外葉面積及 (B) 地上部乾重對應其觀測值之散布圖。

Fig. 7. Scatter plots of the predicted vs. observed values for (A) logarithmic outer leaf area, ln(A) and (B) shoot dry weight, ln(w), with the datasets (M1_382, M2_474, M3_427 and M4_550) by using the coupled modeling procedures of linear (LIN), Gopertz (GOP) and Logistic (LOG) models, respectively.

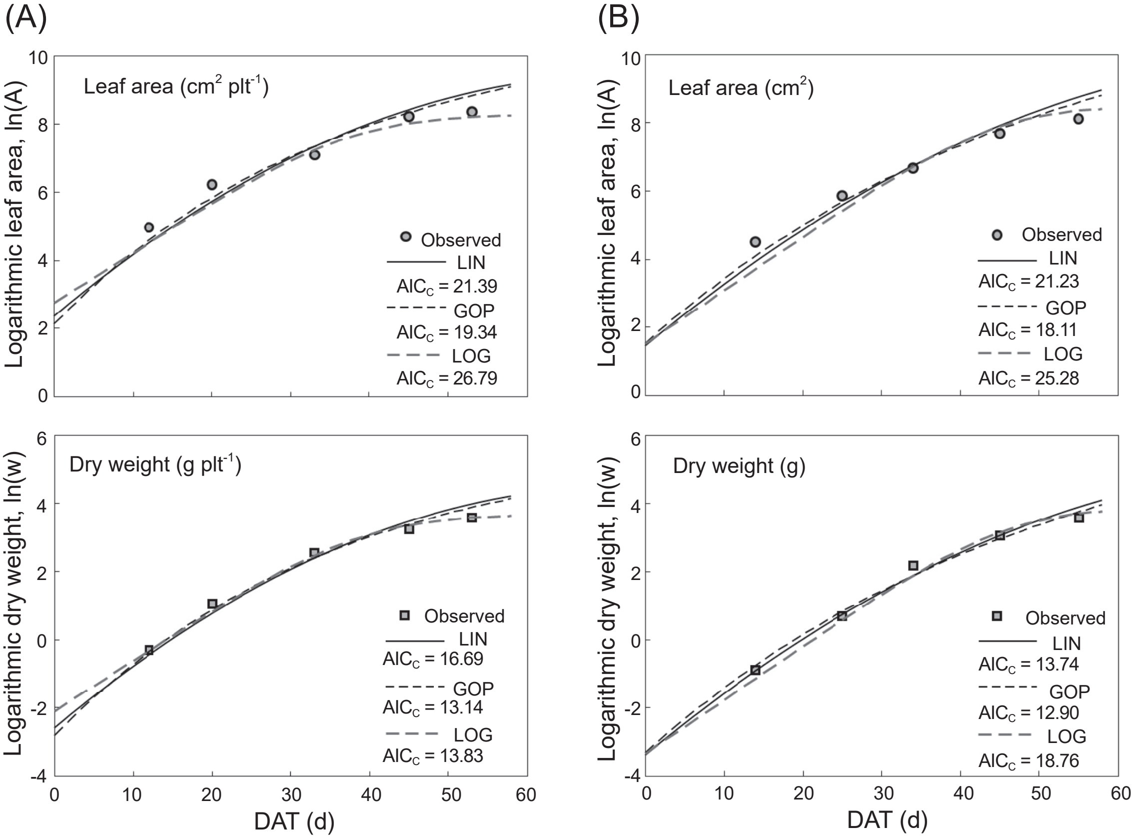

圖 8. 以試驗資料 (A) V1_427 和 (B) V2_382 驗證 3 種模式：線性 (LIN)、Gopertz (GOP) 及 Logistic (LOG) 對結球萵苣外葉面積和地上部乾重的模式耦合曲線。AIC_C 表示赤池資訊量準則 (Akaike information criterion)，供評估模式耦合曲線的適配性。

Fig. 8. Use of both datasets (A) V1_427 and (B) V2_382 for validation of models coupling curves in logarithmic values of iceberg lettuce's outer leaf area and shoot dry weight with the 3 models: linear (LIN), Gopertz (GOP) and Logistic (LOG). AIC_C is Akaike information criterion for assessing the good-of-fit of models coupling curves.

耦合程序的操作及應用便利性的整體考量，具普遍適用性的 LIN 和 GOP 模式可被優先選擇。

本研究為能直接驗證 3 種模式的耦合模擬函數 $F_S(t|a', b', c')$，推估結球萵苣外葉面積和地上部乾重生長的預測準確度，故以兩組驗證資料 V1_427 和 V2_382 進行模擬推估的驗證，表 4 為驗證組別資料 V1_427 和 V2_382 的耦合參數 a'、b' 和 c'，其中 a' 和 b' 以 V1_427 和 V2_382 兩組驗證資料於表 1 中的溫度指標 19.8 和 21.0 代入式 (11) 和式 (12) 求出，因為式 (11) 和式 (12) 的溫度指標函數關係是由附錄 1 的 4 組模式化資料所產生，估算 V1_427 和 V2_382 的 a' 和 b' 僅需植株生育期間之溫度記錄，換算溫度指標即可；再以算出的耦合參數 a' 和 b' 分別替代式 (8)、式 (9) 和式 (10) 中的參數 a 和 b，如式 (13)、式 (14) 和式 (15) 中所述之關係，可分別供 3 種模式計算植株受溫度變化影響的生長量：$(-b'/2)t^2 + a'\,t$、$(-a'/b')\cdot\exp(-b'\,t)$ 和 $a'\,b'\,t$。再依式 (13a)、式 (14a) 和式 (15a) 所示之關係，將求出的耦合參數 a' 和 b' 以及附錄 2 外葉面積和地上部乾重的 5 個生長紀錄觀測值分別代入，由式 (16) 計算出 c'，即可個別完成兩組驗證資料的生長模擬函數：$F_{V1_427}(t|a', b', c')$ 和 $F_{V2_382}(t|a', b', c')$；由於 c' 的估算過程需要所在田區植株生長紀錄的實測資料，可優先引用相同田區和相近栽培管理程序之歷史資料，亦可引用當期作植株生長初期的紀錄資料估算 c'，以對後續生長表現、採收時間與收穫產量進行預測評估。本研究以式 (17) 和式 (18) 分別計算出 3 種模式耦

合函數模擬推估值的 MAE 和 MSE (如表 4)，對外葉面積的推估驗證，3 種模式的 MAE 皆小於 0.4，而 MSE 皆小於 0.2；對於地上部乾重的推估驗證，3 種模式的 MAE 多小於 0.2，而 MSE 多小於 0.04，僅 LIN 模式套用組別 V1_427 有偏高趨勢，顯示本研究提出耦合季節性溫度差異和農地變異的程序建構結球萵苣生長模擬函數，其運算操作的可行性與推估外葉面積和地上部乾重生長的準確度，皆可獲得初步確認。

針對組別資料 V1_427 的驗證結果，無論是外葉面積和地上部乾重，LOG 模式的 MAE 和 MSE 都明顯低於 LIN 和 GOP 模式，而 GOP 模式又低於 LIN 模式，顯示 LOG 模式的耦合模擬預測準確度最高，而 GOP 次之；然而對於 V1_382 的驗證結果，以 GOP 模式模擬預測外葉面積的 MAE 和 MSE 明顯低於以 LIN 和 LOG 模式的模擬預測，但對於地上部乾重的模擬預測，則 3 種模式的準確度並無明顯差異和特定趨勢。圖 7 是將 3 種模式建構的耦合模擬函數曲線套疊於觀測資料，LOG 模式的耦合模擬曲線在生長初期明顯偏離觀測值，但後期與觀測值的吻合度明顯較高，而 LIN 和 GOP 模式的耦合模擬曲線相近，卻於生長後期明顯高估偏離觀測值。再進一步以適配性指標 AIC_c 比較模式偶合模擬曲線套疊的吻合度，可發現相較 LIN 和 LOG 模式，GOP 模式的耦合模擬曲線 AIC_C 皆較低，然而 LOG 模式僅對 V1_427 地上部乾重的模擬預測 AIC_C 較低 (圖 7A 之下圖)，其它則偏高；因此 GOP 模式的耦合模擬曲線套疊完整生育期間之觀測值，吻合度最高。

結論

本研究以結球萵苣的相對葉生長率 (RLR) 和相對生長速率 (RGR) 做為建構生長模式的論述基礎，比較線性 (LIN)、Gopertz (GOP) 和 Logistic (LOG) 模式套配外葉面積和地上部乾重生長資料的適配性，結果顯示 3 種模式描述外葉面積和地上部乾重的生長曲線皆具適用性，但 3 種模式的適配性可能因氣候條件及環境差異的影響有明顯差異。再者，套配 3 種模式估算的參數 *a* 和 *b* 不僅可供說明生育期間 RGR 和 RLR 的變動趨勢，而且依據參數 *a* 和 *b* 對應溫度指標 (T-index) 的關係，以溫度耦

表 4. 以 2 組結球萵苣的外葉面積和地上部乾重的生長曲線資料 (附錄 2) 估算線性 (LIN)、Gopertz (GOP) 和 Logistic (LOG) 模式的耦合參數 *a′*、*b′* 和 *c′*，並分別以平均絕對誤差 (MAE) 和均方差 (MSE) 驗證之。

Table 4. Parameters *a′*, *b′*, and *c′* obtained by coupling procedures for linear (LIN), Gopertz (GOP) and Logistic (LIN) models, respectively, with 2 datasets of iceberg lettuce's growth curves (Appendix 2) for outer leaf area (A) and shoot dry weight (w) and validation by using mean absolute error (MAE) and mean squared error (MSE).

Dataset and site	Parameter obtained by coupling	Leaf area (A) $\ln(A) = F_S(t\|a', b', c')$			Dry weight (w) $\ln(w) = F_S(t\|a', b', c')$		
		LIN[z]	GOP[y]	LOG[x]	LIN	GOP	LOG
V1_427	*a′*	0.1954	0.2406	4057.3000	0.1954	0.2406	40.5730
	b′	2.678×10^{-3}	0.0275	3.67×10^{-5}	2.678×10^{-3}	0.0275	3.67×10^{-3}
	c′	2.3452	10.8680	-5.5528	-2.6093	5.9800	-5.7921
	MAE	0.3954	0.3189	0.1641	0.2485	0.1695	0.0882
	MSE	0.1788	0.1185	0.0491	0.0698	0.0343	0.0144
V2_382	*a′*	0.1920	0.2093	5073.7000	0.1920	0.2093	50.7370
	b′	2.160×10^{-3}	0.0194	3.12×10^{-5}	2.160×10^{-3}	0.0194	3.12×10^{-3}
	c′	1.4416	12.2960	-7.0275	-3.3993	7.4551	-7.2749
	MAE	0.3541	0.2542	0.3421	0.1356	0.1652	0.1784
	MSE	0.1731	0.0928	0.1933	0.0387	0.0327	0.0376

[z] $F_S(t|a', b', c')_{LIN} = (-b'/2)t^2 + a' t + c'$.
[y] $F_S(t|a', b', c')_{GOP} = (-a'/b') \exp(-b' t) + c'$.
[x] $F_S(t|a', b', c')_{LOG} = \ln\{a'/[1 + \exp(-c') \cdot \exp(-b' t)]\}$.

合方程式 a(T) 和 b(T) 可預估季節性氣候溫度改變對植株生長速率影響，並估算出耦合參數 a' 和 b'；結合特定田區 (S) 的植株生長資料，可再推算出代表農地變異影響植株生長的耦合參數 c'，依據 LIN、GOP 和 LOG 模式定義，將耦合參數 a'、b' 和 c' 代入，即可得出耦合溫度變化及農地變異之生長模擬函數 $F_S(t|a', b', c')$；由耦合模擬的結果顯示，相較 LIN 和 GOP 模式，以 LOG 模式耦合模擬外葉面積和地上部乾重在生育期後段的預測準確度高，較有利準確推估最適採收期與最終收穫產量，若以耦合程序的操作及應用性考量，以普遍適用的 LIN 和 GOP 模式可被優先選擇。綜觀本研究結果，以耦合模擬程序 (圖 2)，推演出結球萵苣的生長模擬函數 $F_S(t|a', b', c')$，可將產區現地 (*in situ*) 影響植株生長的氣候條件和農地變異導入生長模式，因此各田區的生長模擬函數具專一性，可更準確預測外葉面積生長與生物量累積之過程；而且 LIN 和 GOP 模式較適合應用於完整生育期的栽培模擬及研擬生產規劃，LOG 模式較適合應用於栽培期間的生長監控與最終產量評估。

引用文獻

Amer, F. A. and W. T. Williams. 1957. Leaf-area growth in Pelargonium zonale. Ann. Bot. 21:339–340. doi:10.1093/oxfordjournals.aob.a083568

Asseng, S., B. T. Kassie, M. H. Labra, C. Amador, and D. F. Calderini. 2017. Simulating the impact of source-sink manipulations in wheat. Field Crops Res. 202:47–56. doi:10.1016/j.fcr.2016.04.031

Babcock, C., A. O. Finley, B. D. Cook, A. Weiskittel, and C. W. Woodall. 2016. Modeling forest biomass and growth: Coupling long-term inventory and LiDAR data. Remote Sens. Environ. 182:1–12. doi:10.1016/j.rse.2016.04.014

Beyene, A. N., H. Zeng, B. Wu, L. Zhu, T. G. Gebremicael, M. Zhang, and T. Bezabh. 2021. Coupling remote sensing and crop growth model to estimate national wheat yield in Ethiopia. Big Earth Data (ahead of print). doi:10.1080/20964471.2020.1837529

Bhatt, G. M. 1976. Variation of harvest index in several wheat crosses. Euphytica 25:41–50.

Bindraban, P. S. 1999. Impact of canopy nitrogen profile in wheat on growth. Field Crops Res. 63:63–77. doi:10.1016/S0378-4290(99)00030-1

Boote, K. J., M. J. Kropff, and P. S. Bindraban. 2001. Physiology and modelling of traits in crop plants: Implications for genetic improvement. Agric. Syst. 70:395–420. doi:10.1016/S0308-521X(01)00053-1

Boote, K. J., J. W. Jones, J. W. White, S. Asseng, and J. I. Lizaso. 2013. Putting mechanisms into crop production models. Plant Cell Environ. 36:1658–1672. doi:10.1111/pce.12119

Breure, T. S., A. E. Milne, R. Webster, S. M. Haefele, J. A. Hannam, S. Moreno-Rojas, and R. Corstanje. 2021. Predicting the growth of lettuce from soil infrared reflectance spectra: The potential for crop management. Precis. Agric. 22:226–248. doi:10.1007/s11119-020-09739-x

Briggs, G. F., F. Kidd, and C. West. 1920a. A quantitative analysis of plant growth. Part I. Ann. Appl. Biol. 1:103–123. doi:10.1111/j.1744-7348.1920.tb05107.x

Briggs, G. F., F. Kidd, and C. West. 1920b. A quantitative analysis of plant growth. Part II. Ann. Appl. Biol. 1:202–223. doi:10.1111/j.1744-7348.1920.tb05308.x

Brisbin, I. L., Jr., C. T. Collins, G. C. White, and D. A. McCallum. 1987. A new paradigm for the analysis and interpretation of growth data: The shape of things to come. The Auk 104:552–554. doi:10.2307/4087567

Buck-Sorlin, G. 2013. Process-based model. p.1755. *in*: Encyclopedia of Systems Biology. (Dubitzky, W., O. Wolkenhauer, K. H. Cho, and H. Yokota, eds.) Springer. New York, NY. 2367 pp. doi:10.1007/978-1-4419-9863-7_1545

Cao, L., P. J. Shi, L. Li, and G. Chen. 2019. A new flexible sigmoidal growth model. Symmetry 11:204. doi:10.3390/sym11020204

Carini, F., A. C. Filho, C. T. Bandeira, I. M. M. Neu, R. V. Pezzini, M. Pacheco, and R. M. Thomasi. 2019. Growth models for lettuce cultivars growing in spring. J. Agric. Sci. 11:147–159. doi:10.5539/JAS.V11N6P147

Carini, F., A. C. Filho, J. M. de Souza, R. V. Pezzini, C. Ubessi, and M. A. Kreutz. 2020a. Fitting a logistic growth model to yield traits in lettuce cultivars growing in summer. Rev. Colomb. Cienc. Hortic. 14:104–114. doi:10.17584/rcch.2020v14i1.8955

Carini, F., A. C. Filho, R. V. Pezzini, J. M. de Souza, G. G. Chaves, and A. Procedi. 2020b. Nonlinear models for describing lettuce growth in autumn-winter. Ciênc. Rural 50:e20190534. doi:10.1590/0103-8478cr20190534

Chen, C. C., D. Y. Lee, and K. W. Juang. 2021. Evaluation of the relationship between growth variations of crisphead lettuce and climate conditions through growth analysis and modeling. J. Taiwan Agric. Res. 70:253–269. doi:10.6156/JTAR.202112_70(4).0003

(in Chinese with English abstract)

Chen, H., M. H. Hsieh, and L. Y. D. Liu. 2019. Incorporation of solar radiation and temperature to estimate production of field growing iceberg lettuce. Crop Environ. Bioinform. 16:98–108. doi:10.30061/CEB.201906_16(2).0004 (in Chinese with English abstract)

Chen, J. J. and C. K. Yang. 2017. To promote smart agriculture- Turn around agriculture in Taiwan. Pub. Gov. Qtly. 5(4):104–111. (in Chinese)

Chen, Y. A. and Y. J. Wang. 2021. The goals of agricultural production in 2021. Agric. Pol. Rev. 346:67–75. (in Chinese)

de Bem, C. M., A. C. Filho, G. G. Chaves, J. A. Kleinpaul, R. V. Pezzini, and A. Lavezo. 2018. Gompertz and logistic models to the productive traits of sunn hemp. J. Agric. Sci. 10:225–238. doi:10.5539/jas.v10n1p225

Fakorede, M. A. B. and J. J. Mock. 1980. Growth analysis of maize variety hybrids obtained from two recurrent selection programmes for grain yield. New Phytol. 85:393–408. doi:10.1111/J.1469-8137.1980.TB03178.X

Fernandes, T. J., A. A. Pereira, and J. A. Muniz. 2017. Double sigmoidal models describing the growth of coffee berries. Ciênc. Rural 47:e20160646. doi:10.1590/0103-8478cr20160646

Fraile-Robayo, R. D., J. G. Álvarez-Herrera, A. J. Reyes M., O. F. Álvarez-Herrera, and A. L. Fraile-Robayo. 2017. Evaluation of the growth and quality of lettuce (*Lactuca sativa* L.) in a closed recirculating hydroponic system. Agron. Colomb. 35:216–222. doi:10.15446/AGRON.COLOMB.V35N2.63439

Gent, M. P. N. 2017. Factors affecting relative growth rate of lettuce and spinach in hydroponics in a greenhouse. HortScience 52:1742–1747. doi:10.21273/HORTSCI12477-17

Gibert, A., E. F. Gray, M. Westoby, I. J. Wright, and D. S. Falster. 2016. On the link between functional traits and growth rate: Meta-analysis shows effects change with plant size, as predicted. J. Ecol. 104:1488–1503. doi:10.1111/1365-2745.12594

Goudriaan, J. and H. H. van Laar. 1994. Modeling Potential Crop Growth Processes. Springer. Dordrecht, The Netherlands. 239 pp.

Grace, J. 1988. Temperature as a determinant of plant productivity. Symp. Soc. Exp. Biol. 42:91–107.

Hatfield, J. L. and J. H. Prueger. 2015. Temperature extremes: Effect on plant growth and development. Weather Clim. Extrem. 10:4–10. doi:10.1016/j.wace.2015.08.001

Hoffmann, W. A. and H. Poorter. 2002. Avoiding bias in calculations of relative growth rate. Ann. Bot. 90:37–42. doi:10.1093/aob/mcf140

Hoogenboom, G., C. H. Porter, V. Shelia, K. J. Boote, U. Singh, J. W. White, L. A. Hunt, R. Ogoshi, J. I. Lizaso, J. Koo, S. Asseng, A. Singels, L. P. Moreno, and J. W. Jones. 2019. Decision support system for agrotechnology transfer (DSSAT), version 4.7.5. DSSAT Foundation, Gainesville, FL, USA.

Hurvich, C. M. and C. L. Tsai. 1989. Regression and time series model selection in small samples. Biometrika 76:297–307. doi:10.1093/BIOMET/76.2.297

Jenni, S. and W. Yan. 2009. Genotype by environment interactions of heat stress disorder resistance in crisphead lettuce. Plant Breed. 128:374–380. doi:10.1111/J.1439-0523.2009.01657.X

Jones, J. W., B. A. Keating, and C. H. Porter. 2001. Approaches to modular model development. Agric. Syst. 70:421–443. doi:10.1016/S0308-521X(01)00054-3

Jones, J. W., G. Hoogenboom, C. H. Porter, K. J. Boote, W. D. Batchelor, L. A. Hunt, P. W. Wilkens, U. Singh, A. J. Gijsman, and J. T. Ritchie. 2003. DSSAT cropping system model. Europ. J. Agronomy 18:235–265. doi:10.1016/S1161-0301(02)00107-7

Jones, J. W., J. M. Antle, B. Basso, K. J. Boote, R. T. Conant, I. Foster, H. C. J. Godfray, M. Herrero, R. E. Howitt, S. Janssen, B. A. Keating, R. Munoz-Carpena, C. H. Porter, C. Rosenzweig, and T. R. Wheeler. 2017. Brief history of agricultural systems modeling. Agric. Syst. 155:240–254. doi:10.1016/j.agsy.2016.05.014

Koester, R. P., J. A. Skoneczka, T. R. Cary, B. W. Diers, and E. A. Ainsworth. 2014. Historical gains in soybean (*Glycine max* Merr.) seed yield are driven by linear increases in light interception, energy conversion, and partitioning efficiencies. J. Exp. Bot. 65:3311–3321. doi:10.1093/jxb/eru187

Liao, F. H., H. Huang, and L. Hung. 1993. Physiology of head formation in cabbage and Chinese cabbage. p.181–192. *in*: Proceedings of a Symposium on Vegetable Production and Development. April 11–12, 1991. Taichung, Taiwan. TARI Spec. Publ. No. 41. Taiwan Agric. Res. Inst., Taichung. (in Chinese with English abstract)

López-Cruz, I. L., A. Ramírez-Arias, and A. Rojano-Aguilar. 2004. Sensitivity analysis of a dynamic growth model for greenhouse grown lettuce (*Lactuca sativa* L.). Agrociencia 38:613–624.

Madariaga, F. J. and J. E. Knott. 1951. Lettuce growth rates: Investigations find heat unit accumulations not a reliable means of predicting harvest time. Calif. Agric. 5:4. doi:10.3733/ca.v005n10p4

McCown, R. L., G. L. Hammer, J. H. G. Hargreaves, D. P. Holzworth, and D. M. Freebairn. 1996. APSIM: A novel software system for model development, model testing and simulation in agricultural systems research. Agric. Syst. 50:255–271. doi:10.1016/0308-521X(94)00055-V

Mischan, M. M., J. R. de Souza Passos, S. Z. de Pinho, and L. R. de Carvalho. 2015. Inflection and stability points of diphasic logistic analysis of growth. Sci. Agric. 72:215–220. doi:10.1590/0103-9016-2014-0212

Moriyuki, S., H. Kaneda, Y. Miyagi, N. Sugimura, and H. Fukuda. 2018. Profit models based on the growth dynamics of lettuce populations in a plant factory. Environ. Control Biol. 56:143–148. doi:10.2525/ecb.56.143

Morrison, R. E. and A. Cunha. 2020. Embedded model discrepancy: A case study of Zika modeling. Chaos 30:051103. doi:10.1063/5.0005204

Muller, B. and P. Martre. 2019. Plant and crop simulation models: Powerful tools to link physiology, genetics, and phenomics. J. Exp. Bot. 70:2339–2344. doi:10.1093/jxb/erz175

Paine, C. E. T., T. R. Marthews, D. R. Vogt, D. Purves, M. Rees, A. Hector, and L. A. Turnbull. 2012. How to fit nonlinear plant growth models and calculate growth rates: An update for ecologists. Methods Ecol. Evol. 3:245–256. doi:10.1111/j.2041-210X.2011.00155.x

Parenti, A., G. Cappelli, W. Zegada-Lizarazu, C. M. Sastre, M. Christou, A. Monti, and F. Ginaldi. 2021. SunnGro: A new crop model for the simulation of sunn hemp (*Crotalaria juncea* L.) grown under alternative management practices. Biomass Bioenerg. 146:105975. doi:10.1016/j.biombioe.2021.105975

Phillips, G. and P. Taylor. 1996. Theory and Application of Numerical Analysis. 2nd ed. Academic Press. San Diego, CA. 447 pp.

Pommerening, A. and A. Muszta. 2015. Methods of modelling relative growth rate. For. Ecosyst. 2:5. doi:10.1186/s40663-015-0029-4

Potter, J. R. and J. W. Jones. 1977. Leaf area partitioning as an important factor in growth. Plant Physiol. 59:10–14. doi:10.1104/pp.59.1.10

Radford, P. J. 1967. Growth analysis formulae- Their use and abuse. Crop Sci. 7:171–175. doi:10.2135/cropsci1967.0011183X000700030001x

Rees, M., C. P. Osborne, F. I. Woodward, S. P. Hulme, L. A. Turnbull, and S. H. Taylor. 2010. Partitioning the components of relative growth rate: How important is plant size variation? Am. Nat. 176:E152–E161. doi:10.1086/657037

Richards, F. J. 1959. A flexible growth function for empirical use. J. Exp. Bot. 10:290–300. doi:10.1093/jxb/10.2.290

Ritchie, J. T. and D. S. NeSmith. 1991. Temperature and crop development. p.5–29. *in*: Modeling Plant and Soil Systems. (Hanks, R. J. and J. T. Ritchie, eds.) American Society of Agronomy. Madison, WI. 545 pp.

Rossi, R., A. Murari, P. Gaudio, and M. Gelfusa. 2020. Upgrading model selection criteria with goodness of fit tests for practical applications. Entropy 22:447. doi:10.3390/e22040447

Roux, S., F. Brun, and D. Wallach. 2014. Combining input uncertainty and residual error in crop model predictions: A case study on vineyards. Eur. J. Agron. 52:191–197. doi:10.1016/J.EJA.2013.09.008

Saiz-Rubio, V. and F. Rovira-Más. 2020. From smart farming towards Agriculture 5.0: A review on crop data management. Agronomy 10:207. doi:10.3390/agronomy10020207

Scaife, A., E. F. Cox, and G. E. L. Morris. 1987. The relationship between shoot weight, plant density and time during the propagation of four vegetable species. Ann. Bot. 59:325–334. doi:10.1093/oxfordjournals.aob.a087321

Scaife, M. A. 1973. The early relative growth rates of six lettuce cultivars as affected by temperature. Ann. Appl. Biol. 74:119–128. doi:10.1111/j.1744-7348.1973.tb07730.x

Shahhosseini, M., G. Hu, I. Huber, and S. V. Archontoulis. 2021. Coupling machine learning and crop modeling improves crop yield prediction in the US Corn Belt. Sci. Rep. 11:1606. doi:10.1038/s41598-020-80820-1

Shimizu, H., M. Kushida, and W. Fujinuma. 2008. A growth model for leaf lettuce under greenhouse environments. Environ. Control Biol. 46:211–219. doi:10.2525/ecb.46.211

Siad, S. M., V. Iacobellis, P. Zdruli, A. Gioia, I. Stavi, and G. Hoogenboom. 2019. A review of coupled hydrologic and crop growth models. Agric. Water Manag. 224:105746. doi:10.1016/j.agwat.2019.105746

Tei, F., D. P. Aikman, and A. Scaife. 1996. Growth of lettuce, onion and red beet. 2. Growth modelling. Ann. Bot. 78:645–652. doi:10.1006/anbo.1996.0172

Tsakmakis, I., N. Kokkos, V. Pisinaras, V. Papaevangelou, E. Hatzigiannakis, G. Arampatzis, G. D. Gikas, R. Linker, S. Zoras, V. Evagelopoulos, V. A. Tsihrintzis, A. Battilani, and G. Sylaios. 2017. Operational precise irrigation for cotton cultivation through the coupling of meteorological and crop growth models. Water Resour. Manage. 31:563–580. doi:10.1007/s11269-016-1548-7

Walther, B. A. and J. L. Moore. 2005. The concepts of bias, precision and accuracy, and their use in testing the performance of species richness estimators, with a literature review of estimator performance. Ecography 28:815–829. doi:10.1111/j.2005.0906-7590.04112.x

Wang, J. Y. 1960. A critique of the heat unit approach to plant response studies. Ecology 41:785–790. doi:10.2307/1931815

Watson, D. 1958. The dependence of net assimilation rate on leaf-area index. Ann. Bot. 22:37–54. doi:10.1093/oxfordjournals.aob.a083596

Weraduwage, S. M., J. Chen, F. C. Anozie, A. Morales, S. E. Weise, and T. D. Sharkey. 2015. The relationship between leaf area growth and biomass accumulation in *Arabidopsis thaliana*. Front. Plant Sci. 6:167. doi:10.3389/fpls.2015.00167

West, C., G. E. Briggs, and F. Kidd. 1920. Methods and significant relations in the quantitative analysis of plant growth. New Phytol. 19:200–207. doi:10.1111/j.1469-8137.1920.tb07327.x

Williams, R. F. 1946. The physiology of plant growth with special reference to the concept of net assimilation rate. Ann. Bot. 10:41–72. doi:10.1093/oxfordjournals.aob.a083119

Winsor, C. P. 1932. The Gompertz curve as a growth curve. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 18:1–8. doi:10.1073/pnas.18.1.1

Yang, C. K., Y. Y. Shih, and S. H. Yang. 2016. Approaching to Taiwan agriculture 4.0 by smart technology. Agric. Pol. Rev. 289:6–11. (in Chinese)

Yin, X., E. A. Lantinga, Ad H. C. M. Schapendonk, and X. Zhong. 2003. Some quantitative relationships between leaf area index and canopy nitrogen content and distribution. Ann. Bot. 91:893–903. doi:10.1093/aob/mcg096

Zeide, B. 1993. Analysis of growth equations. Forest Sci. 39:594–616. doi:10.1093/forestscience/39.3.594

附錄1. 供模式化步驟的4組結球萵苣生長曲線資料：移植日數 (DAT)、植株外葉面積 (A) 和地上部乾重 (w)，以及對數化面積和乾重 ln(A) 和 ln(w)。

Appendix 1. Four datasets of iceberg lettuce's growth curves used in the modeling procedures: days after transplanting (DAT), outer leaf area (A) and shoot dry weight (w) of lettuce plant, and logarithmic values of A and w, ln(A) and ln(w).

Datasets and sites	DAT	Outer leaf area (A)	Shoot dry weight (w)	ln(A)	ln(w)
	------ d ------	------ $cm^2\ plt^{-1}$ -----	-------- $g\ plt^{-1}$ -------		
M1_382	10	52.86 (1.61)[z]	0.3419 (0.0141)	3.9676	-1.0731
	23	294.80 (20.60)	1.3177 (0.1223)	5.6864	0.2759
	35	1,891.90 (107.10)	11.0140 (0.4446)	7.7284	2.3992
	43	4,134.50 (226.60)	23.3670 (0.8235)	8.3271	3.1513
	51	5,817.90 (102.80)	37.5340 (1.7114)	8.6687	3.6252
M2_474	10	117.70 (4.83)	0.3902 (0.0170)	4.7684	-0.9410
	21	492.20 (15.50)	1.9262 (0.0552)	6.1988	0.6555
	31	1,637.30 (65.70)	8.6766 (0.2647)	7.4008	2.1606
	42	2,321.30 (65.30)	13.4220 (0.3251)	7.7499	2.5969
	52	2,566.40 (97.00)	28.0160 (0.8584)	7.8503	3.2328
M3_427	19	164.30 (9.69)	0.9874 (0.0579)	5.1015	-0.0127
	29	747.90 (18.00)	3.3430 (0.1014)	6.6173	1.2069
	41	1,365.20 (29.40)	11.3100 (0.3032)	7.2191	2.4257
	50	1,991.70 (26.20)	19.3030 (0.5543)	7.5967	2.9602
	58	2,340.50 (61.20)	24.3660 (0.7335)	7.7581	3.1932
M4_550	19	222.00 (10.90)	0.7864 (0.0422)	5.4024	-0.2402
	31	782.70 (17.30)	4.0271 (0.1997)	6.6627	1.3930
	40	1,877.20 (44.70)	11.9220 (0.3116)	7.5375	2.4784
	51	2,517.30 (105.00)	22.4700 (0.7285)	7.8309	3.1120
	59	4,168.90 (285.70)	32.8700 (0.7354)	8.3354	3.4925

[z] Values in parentheses are standard errors (n = 6).

附錄 2. 供驗證的 2 組結球萵苣生長曲線資料：移植日數 (DAT)、植株外葉面積 (A) 和地上部乾重 (w)，以及對數化面積和乾重 ln(A) 和 ln(w)。

Appendix 2. Two datasets of iceberg lettuce's growth curves used in the validation: days after transplanting (DAT), outer leaf area (A) and shoot dry weight (w) of lettuce plant, and logarithmic values of A and w, ln(A) and ln(w).

Datasets and sites	DAT	Outer leaf area (A)	Shoot dry weight (w)	ln(A)	ln(w)
	------ d ------	------ cm^2 plt^{-1} -----	-------- g plt^{-1} -------		
V1_427	12	144.80 (11.80)[z]	0.7400 (0.0626)	4.9754	-0.3065
	20	506.10 (22.20)	2.8762 (0.1221)	6.2268	1.0565
	33	1,207.10 (28.60)	12.8740 (0.4547)	7.0960	2.5552
	45	3,758.60 (293.50)	25.7460 (0.9909)	8.2318	3.2483
	53	4,361.50 (222.80)	36.0260 (0.9326)	8.3806	3.5842
V2_382	14	90.96 (6.11)	0.4086 (0.0223)	4.5104	-0.9851
	25	350.50 (8.58)	2.0134 (0.0720)	5.8594	0.6998
	34	786.60 (24.50)	8.9092 (0.3304)	6.6677	2.1871
	45	2,162.00 (127.60)	21.2800 (0.9490)	7.6788	3.0578
	55	3,356.60 (111.40)	35.8950 (1.4955)	8.1187	3.5806

[z] Values in parentheses are standard errors (*n* = 6).

附錄 3. 相對生長率 (RGR) 和相對葉生長率 (RLR) 的動態趨勢以泰勒級數展開表示為時間的線性函數 f(t)。

Appendix 3. Expression of relative growth rate (RGR) and relative leaf-growth rate (RLR) in linear functions of time f(t) with the Taylor-series expansion.

假設 RLR 和 RGR 的變動趨勢為時間函數 f(t)，在接近 t = 0 附近以泰勒級數展開 (Taylor-series expansion) 表示如下 (Phillips & Taylor 1996)：

$$f(t) = f(0) + t \cdot f'(0) + t^2/2! \cdot f''(0) + t^3/3! \cdot f^{(3)}(0) + \cdots + t^m/m! \cdot f^{(m)}(0) + \cdots， \tag{A1}$$

其中 $f^{(m)}(0)$ 表示在 t = 0 附近的 *m* 次微分值，可依試驗資料的生長曲線特徵和不同時間觀測點數決定簡化級數項次：

$$f(t) = f(0) 、 \tag{A2a}$$

$$f(t) = f(0) + f'(0) \cdot t 、 \tag{A2b}$$

$$f(t) = f(0) + f'(0) \cdot t + f''(0) \cdot t^2/2! 、 \tag{A2c}$$

……………………………………………………。

因此，當 RLR 或 RGR 的變動趨勢缺乏相關理論假設或專家經驗推薦時，可考慮優先以時間的級數線性函數表示，雖可擴增級數線性函數的項次以提升配適性，但擴增項次即增加未知係數的估算，亦不利既有資料觀測點數 (n = 5) 的適配性評估。而當生長曲線特徵近似 S 型曲線時，建議可優先選擇僅需兩項係數的非線性函數式 (6) 和式 (7)。

Comparison of Different Models Coupled with Temperature Changes and Farmland Variation for Modeling Growth of Iceberg Lettuce

Chu-Chung Chen[1,2], Dar-Yuan Lee[3], and Kai-Wei Juang[4,*]

Abstract

Chen, C. C., D. Y. Lee, and K. W. Juang. 2022. Comparison of different models coupled with temperature changes and farmland variation for modeling growth of iceberg lettuce. J. Taiwan Agric. Res. 71(1):49–72.

Iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown during the cool seasons in Taiwan is the flagship vegetable to export,. High temperatures in summer will retard or violate the heading physiology of iceberg lettuce, so Taiwan's iceberg lettuce is routinely grown from early autumn to the late spring of next year. In the growth of iceberg lettuce, the outer leaves expending would be a major source of photosynthates; the leafy head which accumulates abundant photosynthates would be a sink. The growth of outer leaves will govern the yield of the leafy head. In smart agriculture, it is essential to optimize the growth model to increase the benefits of cropping management in smart agriculture, while coping with the growth variation in different crops. Linear (LIN), Gopertz (GOP), and Logistic (LOG) models are frequently used for modeling crop growth. In the present study, relative leaf-growth rate (RLR) and relative growth rate (RGR) are fundamental to developing the growth model of iceberg lettuce. The growth curves for shoot dry weight and outer leaf area were fitted to LIN, GOP, and LOG models. And model coupling procedures with the seasonal temperature changes and farmland variation were proposed to improve the prediction of the growth modeling. Two experimental sites, No. 427 and 382, are located at Erlun Township, Yunlin County and the other two sites, No. 474 and 550, are located at Mailio Township, Yunlin County. The growth survey of lettuce plants at sites No. 427 and 382 was carried out in the Winter 2017 and Spring 2018 cropping seasons, respectively. At sites No. 474 and 550, the growth survey of lettuce plants was only conducted in the cropping season Winter 2017. A total of six datasets were used in the study for model fitting assessment and validation. The results showed that LIN, GOP, and LOG models were well fitted to the growth curves of the outer leaf area and shoot dry weight. The goodness-of-fit for the models would be varied by the climate of growing seasons and environmental variation of sites. Parameters *a* and *b* obtained from the models fitting could be used to describe the dynamics of RGR and RLR in growth periods; also, the values of *a* and *b* were imported by the coupling expressions, *a*(T) and *b*(T), with temperature (T) to evaluate the influences of seasonal temperature changes on the growth rates. In addition, *a*(T) and *b*(T) were combined with data of plant growth recordings on the site (S) to obtain coupling parameters *a′*, *b′*, and *c′*. Then, the growth modeling functions, $F_S(t|a', b', c')_{LIN}$, $F_S(t|a', b', c')_{GOP}$, and $F_S(t|a', b', c')_{LOG}$, corresponding to LIN, GOP, and LOG models were developed, respectively. Compared with $F_S(t|a', b', c')_{LIN}$ and $F_S(t|a', b', c')_{GOP}$, $F_S(t|a', b', c')_{LOG}$ was more accurate in the predictions of outer leaf area and shoot dry weight at the later growth periods; thus, LOG model used in the coupled modeling procedure would be more suitable for prediction of the time to harvest and the yield of leafy heads. If the range of application and convenience of use are the priorities for modeling the growth of iceberg lettuce, LIN, and GOP models will be the superior options in models coupling.

Key words: Growth analysis, Models coupling, Linear model, Gopertz model, Logistic model.

Received: August 31, 2021; Accepted: Novmber 15, 2021.
[*] Corresponding author, e-mail: kwjuang@mail.ncyu.edu.tw
[1] Doctoral Student, Department of Agricultural Chemistry, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.
[2] Associate Research Fellow, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[3] Professor, Department of Agricultural Chemistry, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.
[4] Professor, Department of Agronomy, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 71(1):73–86 (2022)
DOI:10.6156/JTAR.202203_71(1).0006

研究報告

鑑定邊境攔截之
陸蓮花微嵌紋病毒 (Ranunculus mild mosaic virus)
及其檢測試劑之製備與應用

陳金枝 [1,*] 廖家翌 [2] 廖敏伶 [3] 劉逸琪 [3] 江芬蘭 [2]

摘要

陳金枝、廖家翌、廖敏伶、劉逸琪、江芬蘭。2022。鑑定邊境攔截之陸蓮花微嵌紋病毒 (ranunculus mild mosaic virus) 及其檢測試劑之製備與應用。台灣農業研究 71(1):73–86。

本研究鑑定進口陸蓮花 (*Ranunculus asiaticus*) 切花上引起葉片嵌紋徵狀之病毒，病葉樣品為行政院農業委員會動植物防疫檢疫局新竹分局於輸入檢疫取樣之荷蘭進口陸蓮花。初步以花卉病毒多元抗體進行間接式酵素連結免疫吸附反應 (indirect enzyme-linked immunosorbent assay; indirect ELISA) 檢測，受測樣品均與 potyvirus 單元抗體 (Agdia Inc., Elkhart, IN, USA) 產生正反應，並能與 potyvirus 簡併式引子對 [HRP-5/Oligo-dT$_{(14)}$] 於 RT-PCR 反應中產生預估大小約 1.3 kbp 之核酸片段，經選殖與定序鑑定後，乃屬於 ranunculus mild mosaic virus (RanMMV) 之核酸序列，並與 GenBank 上已登錄之 RanMMV (Accession No. LC387972) 之鞘蛋白核苷酸及胺基酸序列有高達 98.6% 以上之相同度，屬相同病毒之分離株。於 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 檢測中，本研究所設計的 RanMMV 引子對 (RanMM-u/RanMM-d) 均可由葉片呈現嵌紋徵狀的陸蓮花切花和罹病種球組織檢出 1.04 kbp 之核酸片段產物。進一步將解得之 RanMMV 鞘蛋白核酸序列共 825 個核苷酸以基因合成法構築於 pET28a(+) 表現載體上，再於 *Escherichia coli* BL21 宿主中進行鞘蛋白之誘導 (分子量約 30.5 kDa)，並將其作為抗原以製備 RanMMV 之多元抗體，可成功用於進口陸蓮花切花及種球上對 RanMMV 之檢測。本研究為首次於邊境截獲國外的陸蓮花病毒 RanMMV，國內尚未有此病毒之發生，本研究成功研製之 RanMMV 核酸及免疫檢測技術，將可提升對進口陸蓮花之邊境檢疫效能。

關鍵詞：陸蓮花、馬鈴薯 Y 屬病毒、多元抗體、RT-PCR 檢測。

前言

陸蓮花 (*Ranunculus asiaticus*) 原產於東地中海地區，16 世紀初從土耳其引入西歐；目前廣泛分布於西歐、南非、北美、以色列和日本 (Turina *et al*. 2006; Emadzade *et al*. 2011)；由於其種類多樣、花型及及花色美麗，為廣被栽培且深受歡迎的花卉。全球主要產區為荷蘭、以色列和義大利，以種球無性繁殖 (Beruto *et al*. 2018)。

罹染病毒病的陸蓮花，切花品質及產量均會受影響 (Restuccia *et al*. 2011)。國際間已記錄可感染陸蓮花的病毒種類至少 15 種 (Restuccia *et al*. 2011)，包括broad bean wilt virus 2 (BBWV-2) (Minutolo *et al*. 2016)、cucumber mosaic virus (CMV) (Ushiyama *et al*. 1989; Hayahi *et al*. 2018)、impatiens necrotic spot virus (INSV) (Vaira *et al*. 1997; Restuccia *et al*. 2011)、plum pox virus (PPV) (van Oosten 1970)、potato virus Y (PVY)

投稿日期：2021 年 8 月 25 日；接受日期：2021 年 11 月 30 日。
[*] 通訊作者：chinzue@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所植物病理組計畫助理。台灣 台中市。
[3] 農委會動植物防疫檢疫局新竹分局技正。台灣 桃園市。

(Bellardi *et al*. 1988)、ranunculus leaf distortion virus (RanLDV) (Turina *et al*. 2006)、ranunculus mild mosaic virus (RanMMV) (Wang *et al*. 2008; Minutolo *et al*. 2016; Hayahi *et al*. 2018)、ranunculus mosaic virus (RanMV) (Turina *et al*. 2006; Ciuffo *et al*. 2011)、ranunculus mottle virus (RMV) (Laird & Dickson 1967; Elliott *et al*. 1988)、ranunculus white mottle virus (RWMV) (Vaira *et al*. 1997, 2000)、tomato spotted wilt virus (TSWV) (Lisa *et al*. 1990; Whitfield *et al*. 2003; Hayahi *et al*. 2018)、turnip mosaic virus (TuMV) (Ohshima *et al*. 2002; Restuccia *et al*. 2011)、tobacco necrosis virus (TNV) 和 tobacco rattle virus (TRV) (Restuccia *et al*. 2011)。其中，RanMMV 首次於義大利的陸蓮花上被發現，引起葉片嵌紋，可經由蚜蟲傳播，寄主範圍局限於毛茛科 (Ranunculaceae) (Turnia *et al*. 2006)。在陸蓮花產區中，RanMMV 更是影響陸蓮花生產品質的關鍵病毒 (Restuccia *et al*. 2011; Hayahi *et al*. 2018)。

RanMMV 為 *Potyvirus* 屬病毒之成員，potyvirus 病毒型態為長絲狀，病毒顆粒大小約 680–900 nm；具有分子量約 30–47 kDa 的蛋白質外鞘 (coat protein; CP)，其基因體乃由分子量大小約 9.7 kb 的單股正極性 RNA (positive sense ssRNA) 所組成。*Potyvirus* 屬病毒的分類可由病毒顆粒形態、媒介昆蟲種類、血清親緣關係和核酸分子特性等方面鑑定之；近年來依據國際病毒分類委員會 (International Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV) (https://talk.ictvonline.org/) 所公布的 *Potyvirus* 屬病毒分類標準：對於 *Potyvirus* 屬病毒的種 (species) 分類界定，主要依據 (1) 完整基因體的核苷酸 (nucleotide; nt) 序列相同度小於 76%、胺基酸小於 82% 者為不同種之病毒；(2) 若以特定蛋白區域的核苷酸相同度進行比較，於 P1 對應區域小於 58%，而於其他區域小於 74–78% 者為不同種；(3) 針對 CP 核苷酸相同度小於 76–77% 且胺基酸小於 80% 者為不同種之病毒 (Adams *et al*. 2005)。此外，*Potyvirus* 屬病毒也可依據其 3’ 端非轉譯區 (3’-noncoding region; 3’-NCR) 之核苷酸序列比對，在高於 80% 相同度者鑑定為相同種的 potyvirus 病毒 (Frenkel *et al*. 1989; Van Regenmortel *et al*. 2000)。

台灣主要以進口陸蓮花切花或種球栽培，開花的高峰期為冬季到春季，對於可能隨種球進口而輸入國內之病毒種類，有必要建立自主檢測能力以因應邊境檢疫或監測之需。本研究針對行政院農業委員會動植物防疫檢疫局新竹分局 (以下簡稱防檢局新竹分局) 於邊境所攔截之進口陸蓮花切花和種球所檢出之 potyvirus 病毒，進行其分子核酸定序與鑑定，確認其為 RanMMV；進一步設計其核酸檢測用引子對，以及應用細菌生合成系統表現 RanMMV 病毒之鞘蛋白作為抗原，成功製備出 RanMMV 多元抗體供免疫檢測用。本研究所開發之核酸或免疫檢測試劑，可應用於邊境檢疫之進口陸蓮花病毒的監測。

材料與方法

材料來源

本研究之試驗樣品來源乃由防檢局新竹分局於 2019–2020 年期間於輸入檢疫時取樣之荷蘭進口 (原產地為義大利) 陸蓮花切花，本試驗以葉片出現有嵌紋徵狀 (mosaic) 者以及進口種球為檢測材料。

以免疫檢測法初步鑑定病毒

由防檢局新竹分局自海關抽樣之陸蓮花切花材料，初步以市售之 potyvirus 單元抗體 (Agdia Inc., Elkhart, IN, USA) 及實驗室之前已製備之 TuMV、CMV 和 TSWV 等花卉病毒抗體進行間接式酵素連結免疫吸附反應 (indirect enzyme-linked immunosorbent assay; indirect ELISA) 檢測，篩選與受測之病毒抗體產生正反應之陸蓮花切花，進行後續之核酸增幅反應及病毒核苷酸定序試驗。

抗血清免疫檢測分析法

Indirect ELISA 法：本試驗參考以往報告進行之 (Clark & Adams 1977; Chang *et al*. 1988; Chen *et al*. 2016)。取 0.1 gm 之受測樣品組織，以 3 mL 之 15 mM 碳酸鈉緩衝液 (sodium carbonate buffer, pH 9.6) 研磨均勻後，加入 96 孔

ELISA 反應盤內，每樣品加 2 孔 (100 µL/孔) 為 2 個重複，置於 37℃ 定溫 3–4 h 進行覆膜反應 (coating reaction)，然後以 1× PBST 緩衝液 (137 mM NaC1, 1.5 mM KH_2PO_4, 1 mM Na_2HPO_4, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 沖洗 3 次；之後分別加入欲檢測之病毒抗體後，放置在 37℃定溫箱反應 2 h；爾後以 1× PBST 緩衝液沖洗 3 次，再加入已稀釋 6,000× 之山羊抗兔二次抗體 (goat anti-rabbit immunoglobin, Jackson, West Grove, PA, USA) (100 µL/孔)，置於 37℃ 定溫箱反應 2 h；最後再以 1× PBST 緩衝液沖洗 4 次後，再以 150 µL/孔之比例加入濃度為 1 mg mL^{-1} 之鹼性磷酸酶酵素基質 (p-NPP) (VWR Life Science, Solon, OH, USA) 進行呈色反應。反應 30 min 後，以 ELISA 讀值儀 (PTI max microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 讀取波長 405 nm 下之吸收值，作為評估病毒濃度高低之依據。樣品吸光值大於健康葉片 2 倍者，判讀為正反應。

西方墨點法：取 0.1 gm 受測樣品之組織，置於 1.5 mL 微量離心管內，加入液態氮研磨均質，加入 200 µL 樣品處理液混勻 (Chen *et al*. 2016)，再加入 200 µL 之 LDS (Laemmli dissociation solution) (Laemmli 1970) 溶液混勻，於沸水中悶熱 3–5 min，以 5,900× *g* 離心 5 min 後取上清液進行電泳分析。樣品經 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 電泳後，取膠體轉漬於 PVDF (polyvinylidene fluoride) 膜 (Immobilion-P; Merck Millipore Ltd., Cork, Ireland) 再與受測之病毒抗體進行反應。

病毒 3’ 端核酸片段之增幅、選殖與定序分析

以本研究受測陸蓮花樣品被 potyvirus 單元抗體檢出有反應者，進一步以單步驟反轉錄-聚合酶鏈鎖反應法 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR) 進行其 3’ 端核酸片段之增幅，將符合預估分子量大小的特定核酸片段產物做選殖後進行核苷酸定序分析，以取得不同病毒分離株之鞘蛋白 (CP) 核酸序列。採用之單步驟 RT-PCR 法反應條件詳述如下。

核酸純化：取 0.1 g 之受測組織，加入液態氮研磨均勻後，依據市售之植物全量核酸萃取試劑組 (Plant Total RNA mini Kit, Viogene, Viogene-BioTek Corparation, Taipei, Taiwan) 步驟，進行供試植物組織樣品之全量核醣核酸 (total RNA) 萃取。

單步驟 RT-PCR 法：以純化所得之 RNA 為模板，使用可增幅 *Potyvirus* 屬病毒核酸 3’ 端 (3’-terminal region) 約 1.3 kbp 之簡併式引子對 HRP-5/Oligo-$dT_{(14)}$ (5’ATGATHGARKCNTGGGG3’/5’GCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTT3’) (Pappu *et al*. 1998; Chen *et al*. 2006) 進行單步驟 RT-PCR 反應。反應條件依據市售 RT-PCR 試劑組 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 之配方，於每一 25 µL 反應液中分別加入 1 µL 之全量 RNA、12.5 µL 之 2× Reaction Mix、0.5 µL 之 SuperScript III RT-/Platinum *Taq* Mix、各 1 µL 之 10 µM 上游和下游引子和 9 µL 之 DEPC-treated water。所有試劑混合均勻後，於熱循環反應儀 (Biometra T3000 Thermocycler, Germany) 中進行。設定反應程序為：50℃下進行反轉錄 30 min、94℃變性 2 min；之後進行 30 個 PCR 循環反應：94℃下變性 1 min、50℃下黏合 1 min，72℃下聚合 1 min，最後一個循環之 72℃聚合反應延長為 6 min。反應結果以 1.2% 電泳瓊膠 (SeaKem, Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME, USA) 進行分析判讀結果。

核酸片段選殖和核苷酸序列分析：經由引子對 HRP-5/Oligo-$dT_{(14)}$ 於 RT-PCR 反應中所增幅出預估分子量大小約 1.3 kbp 的核酸片段，選殖於 pGEM-T Easy Vector Systems 載體上 (Promaga, Madison, WI, USA)，篩選出含有此特定嵌入序列 (insert sequence) 選殖株送交核酸定序公司 (明欣生物科技有限公司，台灣台北市)，以自動核酸定序儀分析其核苷酸序列，所得序列以 Vector NTI Suite (InforMax Inc., WI, USA) 軟體進行分析，並與美國國家生物科技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) 基因資料庫 (GenBank) 已登錄的 *Potyvirus* 屬病毒之 CP 核苷酸和胺基酸序列進行比對分析。

RanMMV 之引子對設計與 RT-PCR 檢測罹病組織

依據從陸蓮花罹病材料所選殖定序完成的 RanMMV 分離株 3’ 端之 1.3 kbp 之核苷酸序列設計 RT-PCR 檢測用專一引子對，上游引子 RanMMVu (5’ GGACAGTTGACTTGGGAGC-TA3’)、下游引子 RanMMVd (5’ CTGTGATT-GAAAGGT GGGTTCC3’)，預估可增幅出產物分子量大小約 1.04 kbp，此片段將可包含全長度 RanMMV-CP 及其兩端核苷酸之序列。取陸蓮花罹病組織，純化其全量核酸作為模板進行單步驟 RT-PCR 反應。設定反應程序為：50℃下進行反轉錄 30 min、94℃變性 2 min；之後進行 30 個 PCR 循環反應：94℃下變性 1 min、52℃下黏合 50 s，72℃下聚合 1 min，最後一個循環之 72℃聚合反應延長為 6 min。反應結果以 1.2% 電泳瓊膠進行分析判讀結果。

RanMMV-CP 表現蛋白誘導及多元抗體製備

依據 RanMMV 分離株定序結果，選取其全長度 CP 核苷酸序列為模板，委託波仕特生物科技股份有限公司 (台灣台北市) 進行全長度 RanMMV-CP 核苷酸合成，並構築於表現載體 pET28a(+) 之質體上 (Novagen Inc., Madison, WI, USA)，質體代號為 pET-RanMMVCP。所合成之核酸片段，包含有對應全長度 CP 之 825 個核苷酸及 CP 核苷酸終止碼 (TAG)、2 種限制酶切位 (分別為 5’ 端之 *NcoI* 和 3’ 端之 *XhoI* 切位)。

將 pET-RanMMVCP 質體轉型於 *Escherichia coli* BL21 宿主內，進行 RanMMV-CP 之表現蛋白誘導與純化，相關試驗方法參照以往研究報告進行 (Chen *et al*. 2018)：轉型株以 M9 培養基培養，並以 1 mg mL^{-1} 之 IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) 誘導蛋白質之表現 (Li *et al*. 1998)。培養之菌液以 5,900× *g* 轉速離心 10 min 後，沉澱物以 0.5 M Tris-EDTA (pH 8.0) 緩衝液溶解均勻，並進行 SDS-PAGE 電泳分析，再經西方墨點法以市售 potyvirus 單元抗體 (Agdia Inc., Elkhart, IN, USA) 確認 RanMMV-CP 抗原之表現。

之後，進一步選用已確定有表現 CP 之 pET-RanMMVCP 選殖株進行大量表現蛋白之誘導與純化 (Li *et al*. 1998; Chen *et al*. 2016)，將純化之表現蛋白濃縮為 1 mg mL^{-1} 以做為抗原，並送交濁水溪生物科技有限公司 (台灣桃園市) 進行每週 1 次、連續 4 wk 的免疫注射於兔子以製備多元抗體。

RanMMV-CP 多元抗體對不同馬鈴薯 Y 屬病毒之檢測

為評估自製多元抗體之檢測效果，本試驗以 indirect ELISA 法進行測試，選用本研究室以往保存之 15 種不同 *Potyvirus* 屬病毒之罹病組織與自製之 RanMMV-CP 多元抗體進行反應，取 0.1 gm 之受測樣品組織進行之。Indirect ELISA 法檢測步驟詳如前述，樣品吸光值大於健康葉片 2 倍讀值者，判讀為正反應。

RanMMV-CP 多元抗體應用於陸蓮花罹病株之檢測

分別取用 2019–2020 年由防檢局新竹分局於輸入檢疫取樣之陸蓮花切花及種球，採取 0.1 gm 之切花葉片或種球組織，以 indirect ELISA 與自製 RanMMV-CP 多元抗體進行反應，流程詳如前述。另以市售之 potyvirus 單元抗體之檢測結果比較之，以評估本研究之自製多元抗體對陸蓮花罹病材料之檢測效果。

取用以 indirect ELISA 檢出正反應之陸蓮花樣品，進一步於西方墨點法中與 RanMMV-CP 多元抗體進行反應，以評估於西方墨點法檢測陸蓮花罹病材料之效果。

結果

邊境攔截之感染陸蓮花切花的病毒初步鑑定

Indirect ELISA 法：本試驗以 indirect ELISA 法檢測 2019 年首次由防檢局新竹分局於輸入檢疫抽樣之陸蓮花切花材料，受測 21 個樣品均呈現嵌紋徵狀 (圖 1) 且僅與市售之 potyvirus 單元抗體產生正反應 (表 1)，顯示此等切花樣品內存在與 potyvirus 有血清類緣相近的病毒。進一步將切花樣品分為花朵、葉片和花

圖 1. 邊境攔截之進口陸蓮花切花呈現葉片嵌紋病徵，檢出有陸蓮花微嵌紋病毒 (ranunculus mild mosaic virus; RanMMV)。

Fig. 1. Mosaic symptoms on leaves of the border-intercepted ranunculus cut flowers positively detected with ranunculus mild mosaic virus (RanMMV).

莖 3 個部位與 potyvirus 單元抗體反應，結果顯示此 21 個樣本檢出的 potyvirus 病毒呈現不均勻分布 (表 1)，在花莖部位可全數檢出，ELISA 正反應平均讀值 1.508；於花朵部位也是全數檢出，正反應平均讀值 0.630；於葉片部位的檢出數最少，為 12 個，正反應平均讀值 0.295，以上結果顯示採樣花莖為檢測材料，可獲得較高的病毒檢出數與讀值。

RT-PCR 法及 3' 端核酸片段定序分析：將與 potyvirus 單元抗體有正反應之陸蓮花切花組織樣品，進一步以 potyvirus 簡併式引子對 HRP-5/Oligo-dT$_{(14)}$ 以 RT-PCR 增幅其 3' 端核酸片段，均可產生與預估分子量約 1.3 kbp 大小的核酸片段 (圖 2A)，將此等增幅產物做選殖於 pGEM-T 載體並進行核苷酸定序分析，所選殖到的 4 個分離株 (RanMMV 1、2、3、4) 之核酸片段，均具有 potyvirus 3' 端的特性，即含有 poly(A) 尾端，且 CP 核苷酸長度均為 825 nts；且 nuclear inclusion b (NIb) 和 CP 之

表 1. 以間接式酵素連結免疫吸附法檢測進口陸蓮花切花各部位組織之病毒分布。

Table 1. Detection of potyvirus on the different portions of ranunculus cut flowers by indirect enzyme-linked immunosorbent assay.

	ELISA reading (A_{405nm})[y]		
Sample[z]	Flower	Leaf	Peduncle
1	0.340	0.140	1.981
2	1.096	0.367	3.174
3	0.589	0.104	2.205
4	0.951	0.210	1.041
5	2.235	0.293	0.828
6	0.352	0.168	1.912
7	0.399	0.133	1.187
8	0.158	0.110	0.255
9	0.464	0.245	2.556
10	0.166	0.106	0.619
11	1.336	0.227	2.461
12	1.355	0.177	1.305
13	0.345	0.158	2.163
14	0.220	0.069	0.338
15	0.342	0.102	0.631
16	1.443	0.107	0.952
17	0.535	0.094	1.103
18	0.122	0.085	0.333
19	0.507	0.110	1.758
20	0.131	1.013	2.655
21	0.157	0.410	2.201
D-CK	3.413	3.413	3.413
2H-CK	0.110	0.110	0.110
No. positive	21	12	21
Av. positive value	0.630	0.295	1.508

[z] Tested samples are cut flowers collected from imported *Ranunculus* in 2019.

[y] The absorbance values were an average of two replicate wells. Samples with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) readings lower than twofold healthy control (2H-CK) were considered undetectable by indirect ELISA. Positive control (D-CK) is the bacterial expressed coat protein of a potyvirus. The monoclonal antibody of potyvirus (Agdia Inc., Elkhart, IN, USA) was used for detection.

辨識位置均為 VFHQ/A (圖 3)，與 GenBank 上已登錄之 RanMMV (Accession No. LC387972) 相同；CP 核苷酸和胺基酸之相同度均與 RanMMV (Accession No. LC387972) 達 98.6% 以上 (表 2、圖 3)，而 3'-NCR 核苷酸序列相同度也

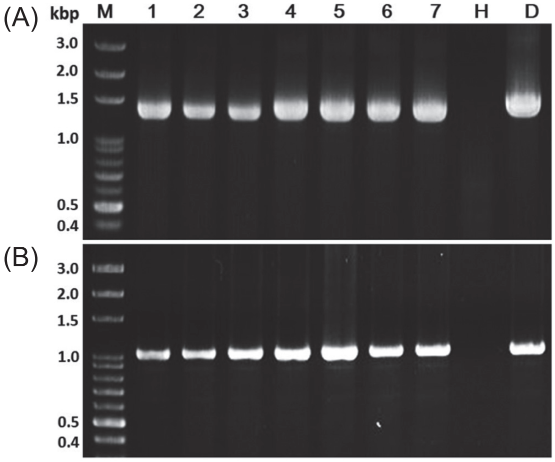

圖 2.　罹染陸蓮花微嵌紋病毒 (ranunculus mild mosaic virus; RanMMV) 之陸蓮花組織的反轉錄 - 聚合酶鏈鎖反應電泳圖。分別以 (A) potyvirus 簡併式引子對和 (B) RanMMV 專一性引子對進行之。行 M：核酸分子量標幟；行 1–7：陸蓮花 RanMMV 罹病葉組織；行 H：健康陸蓮花葉組織；行 D：RanMMV 罹病組織正對照。

Fig. 2.　Agarose gel electrophoresis of DNA products amplified from reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) of the ranunculus mild mosaic virus (RanMMV) isolate by (A) the primer pairs of potyvirus-degenerate primers and (B) RanMMV specific primers, respectively. Lane M: molecular marker; lanes 1–7: RanMMV-infected tissues; lane H: the healthy control; lane D: the positive control of RanMMV. The predict amplicons of A and B were 1.3 kbp and 1.04 kbp, respectively.

高達 99.5% 以上 (表 2)；但與感染陸蓮花之另一種potyvirus (ranunculus mosaic virus; RanMV) (Accession No. DQ152192; Turina *et al*. 2006)，CP 核苷酸和胺基酸之相同度分別為 60.7% 及 56.4%，3’-NCR 核苷酸序列相同度則僅為 44.2% (表 2)。依據 *Potyvirus* 屬病毒胺基酸序列特性 (Ward *et al*. 1992; Adams *et al*. 2005)，歸納本研究所解得之陸蓮花病毒核酸序列，均為 *Potyvirus* 屬之 RanMMV。

以自行設計之 RanMMV 引子對和 RT-PCR 檢測罹病組織

本研究依據 RanMMV 分離株的 3’ 端 1.3 kbp 之核苷酸序列所設計的 RanMMVu/RanMMVd 引子對，於 RT-PCR 反應中，分別可由陸蓮花切花組織 (圖 2B) 和種球組織 (圖 4)，獲得預估分子量大小約 1.04 kbp 的核酸片段產物；且核苷酸定序結果，確屬 RanMMV 之序列 (結果未出示)。由 21 個進口種球中，檢出 7 個帶有 RanMMV，檢出率約 33.3%。本結果顯示，所設計的引子對可成功應用於陸蓮花組織的檢測，尤其是對於進口種球僅採樣其組織仍可檢出此病毒。

表 2.　邊境攔截之陸蓮花微嵌紋病毒 ranunculus mild mosaic virus (RanMMV) 分離株與已登錄於 GenBank 之其他 *Potyvirus* 病毒鞘蛋白基因序列分析比對。

Table 2.　Percent identities of the nucleotide and amino acid sequences of the coat protein region of ranunculus mild mosaic virus (RanMMV) isolates to other ranunculus potyviruses available in GenBank.

	Percent identity of[y]		
Virus isolate[z]	CP-nt	CP-aa	3’-NCR
RanMMV (LC387972)	100.0	100.0	100.0
RanMMV (EU684747)	99.8	99.6	99.5
RanMMV 1	99.8	99.6	100.0
RanMMV 2	99.4	98.6	100.0
RanMMV 3	99.4	99.3	100.0
RanMMV 4	99.5	99.6	99.5
RanMV (DQ152192)	60.7	56.4	44.2

[z] The sequences of various Ranunculus potyvirus coat protein genes used in this study were obtained from GenBank, including ranunculus mild mosaic virus (RanMMV) (Accession No. LC387972 & EU684747) and ranunculus mosaic virus (RanMV) (Accession No. DQ152192). Sequences of RanMMV 1–4 were molecularly cloned in this study.

[y] Sequences analysis was conducted using of the program of Vector NTI Suite (InforMax Inc., WI, USA).

陸蓮花 RanMMV-CP 多元抗體之製備與檢測效果

本研究於 *E. coli* 細菌宿主內誘導之陸蓮花 RanMMV-CP 表現蛋白，為預估包含有對應全長度 CP 之 275 個胺基酸的融合性蛋白 [CP 的 N 端外加有表現載體 pET28a(+) 的 1 個胺基酸]，於 SDS-PAGE 的電泳分析中可見融合性表現蛋白之分子量約為 30.5 kDa，與預估值相符，而不含有 RanMMV-CP 核酸的表現載體 pET28a(+) 未偵測到此對應條帶 (圖 5A)。於西方墨點法中，市售 *Potyvirus* 屬病毒的單元抗體可與 RanMMV-CP 表現蛋白產生正反

圖 3. 不同陸蓮花微嵌紋病毒 (ranunculus mild mosaic virus; RanMMV) 分離株之鞘蛋白胺基酸序列比對。

Fig. 3. Alignment of the amino acid sequences of different ranunculus mild mosaic virus (RanMMV) isolates. RanMMV 1, 2, 3, and 4 were collected from the imported cut flowers of *Ranunculus asiaticus*; The RanMMV isolate (LC387972) is available in GenBank was used for comparison.

應 (圖 5B)，顯示本研究之 RanMMV-CP 表現蛋白具有 *Potyvirus* 病毒之抗原特性。以表現蛋白為抗原所製備之 RanMMV-CP 多元抗體，可與其同源的 RanMMV-CP 表現蛋白產生正反應 (圖 5C)。

以 indirect ELISA 法評估 RanMMV-CP 多元抗體檢測陸蓮花罹病組織和其他來源的 potyvirus 受測樣品的效果上，RanMMV-CP 多元抗體對於其細菌表現之鞘蛋白同源抗原 (D-CK) 及 RanMMV 罹病組織均具有高於 1.5 的

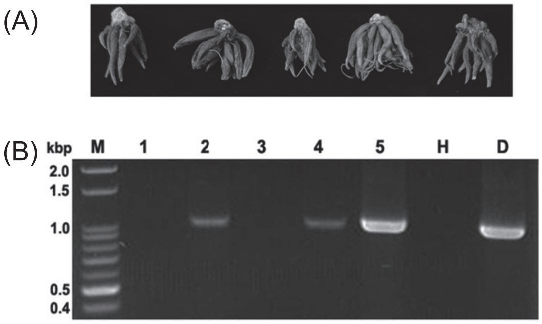

圖 4.　以陸蓮花微嵌紋病毒 (ranunculus mild mosaic virus; RanMMV) 專一引子對進行陸蓮花種球組織之反轉錄 - 聚合酶鏈鎖反應的電泳圖；(A) 陸蓮花種球和 (B) 電泳圖。罹染 RanMMV 者可檢出 1.04 kbp. 之核酸片段產物。行 M：核酸分子量標幟；行 1–5：進口陸蓮花種球；行 H：健康陸蓮花葉組織；行 D：RanMMV 罹病組織正對照。

Fig. 4.　Agarose gel electrophoresis of DNA products of ranunculus mild mosaic virus (RanMMV) amplified from ranunculus bulbs in reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with the RanMMV specific primers. (A) The picture showed ranunculus bulbs and (B) RT-PCR amplicons; The 1.04-kbp amplicons were detected from those RanMMV-infected bulbs. Lane M: molecular marker; lanes 1–5: ranunculus bulbs; lane H: the healthy control; lane D: the positive control of RanMMV; The predict amplicons was 1.04 kbp.

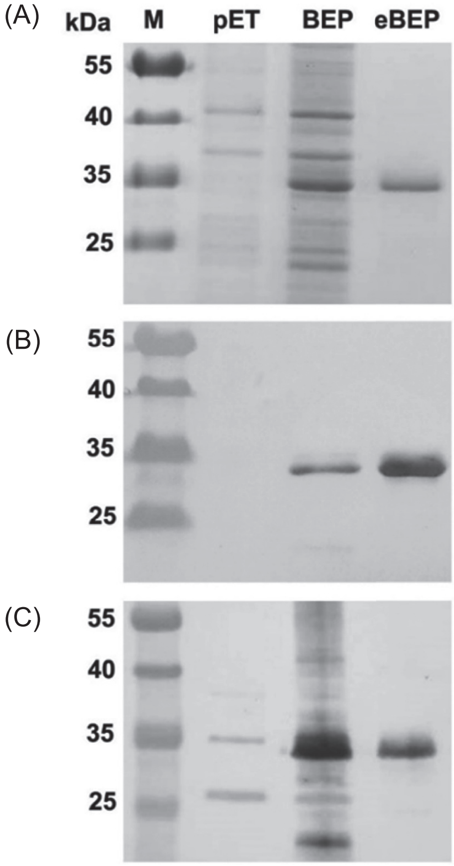

圖 5.　應用細菌大量表現的陸蓮花微嵌紋病毒 (ranunculus mild mosaic virus; RanMMV) 分離株融合性表現蛋白之 SDS-PAGE 及西方墨點法分析。(A) RanMMV 融合性表現蛋白 (30.5 kDa) 之 SDS-PAGE 蛋白質電泳圖。受測樣品分別與 (B) Agdia 公司出品之 potyvirus 單元抗體和 (C) 自製之 RanMMV 多元抗體進行西方墨點法分析。行 M：蛋白質分子量標幟；行 pET：未帶有病毒鞘蛋白之細菌載體 pET28a(+)；行 BEP：細菌表現之病毒鞘蛋白；行 eBEP：純化後之細菌表現的病毒鞘蛋白。

Fig. 5.　Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blotting assays of the bacterial-expressed coat protein (CP) of ranunculus mild mosaic virus (RanMMV). (A) A 30.5-kDa bacterial-expressed fusion protein of RanMMV-CP was observed in the SDS-PAGE assay. The tested samples were reacted with (B) the purchased monoclonal antibody of potyvirus (Agdia Inc., Elkhart, IN, USA), and (C) the polyclonal antibody of RanMMV-CP prepared in this study. Lane M: protein markers; lane pET: IPTG-induced bacterial cell lysate containing the expression vector pET28a(+) without RanMMV-CP insert; lane BEP: IPTG-induced bacterial cell lysate containing pET28a(+) with RanMMV-CP insert; lane eBEP: the purified bacterial-expressed RanMMV-CP.

正反應讀值 (表 3)，與其他受測的 potyvirus 罹病組織反應結果僅與 gomphocarpus mosaic virus (GoMV)、TuMV-YC5、bean common mosaic virus (BCMV)-BlCM、zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) 和 papaya ringspot virus (PRSV) 有正反應，且讀值僅介於 0.3–0.7 之間，顯示 RanMMV-CP 多元抗體雖對其他的 potyvirus 也具有檢測效力，但仍以與同源之 RanMMV 反應值較高 (表 3)。

RanMMV-CP 多元抗體與防檢局於 2019–2020 年期間由輸入檢疫取樣的陸蓮花葉片嵌紋罹病材料或種球組織的讀值均為正反應值，介於 0.86–3.01 間 (表 4)，且其對檢出有病毒的正反應樣品數，與市售的 potyvirus 抗血清所檢出者相同 (表 4)；進一步以西方墨點法檢測發現此多元抗體也可與陸蓮花 RanMMV 罹病樣品產生正反應條帶 (圖 6)。

由上述結果顯示自製之 RanMMV-CP 多元抗體於上述兩種免疫檢測法中，皆可成功檢測

表 3. 利用細菌表現之陸蓮花微嵌紋病毒 ranunculus mild mosaic virus (RanMMV) 融合性鞘蛋白所製備的多元抗體於間接式酵素連結免疫吸附法檢測不同 *Potyvirus* 病毒之效果。

Table 3. Detection efficiency of the polyclonal antibodies produced with bacterial expressed fusion coat protein of ranunculus mild mosaic virus (RanMMV) by indirect enzyme-linked immunosorbent assay.

	ELISA reading (A_{405nm})[y]	
Sample[z]	Agdia-Potyvirus	Anti-RanMMVCP
Ranunculus mild mosaic virus (RanMMV)		
RanMMV 1	1.425	1.630
RanMMV 2	2.389	2.496
RanMMV 3	1.501	2.095
RanMMV 4	2.384	2.090
gomphocarpus mosaic virus (GoMV)	0.838	0.682
turnip mosaic virus (TuMV)-YC5	0.853	0.465
East Asian passiflora virus (EAPV)	1.098	0.098
telosma mosaic virus (TeMV)	1.292	0.110
soybean mosaic virus (SMV)	0.084	0.128
potato virus Y (PVY)-potato	0.075	0.117
bean yellow mosaic virus (BYMV)	0.351	0.131
bean common mosaic virus (BCMV)-BlCM	2.718	0.621
gloriosa stripe mosaic virus (GSMV)	0.125	0.188
lily mottle virus (LMoV)	0.923	0.172
zantedeschia mild mosaic virus (ZaMMV)	1.535	0.258
zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)	1.869	0.348
ornithogalum mosaic virus (OrMV)	0.826	0.153
papaya ringspot virus (PRSV)	2.514	0.403
lycoris potyvirus	0.132	0.244
D-CK	2.292	2.284
2H-CK	0.098	0.112

[z] Tested potyviruses are preserved diseased materials in the laboratory.
[y] The absorbance values were an average of two replicate wells. Samples with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) readings lower than twofold healthy control (2H-CK) were considered undetectable. Positive control (D-CK) is the bacterial expressed viral protein. The monoclonal antibody of potyvirus (Agdia Inc., Elkhart, IN, USA) was used for comparison.

到同源抗原 RanMMV，也可應用於陸蓮花上對相同病毒的檢測。

討論

本研究以核酸分子生物技術和血清學方法鑑定由邊境輸入檢疫取樣之進口陸蓮花切花與種球，首次成功鑑定其帶有屬於馬鈴薯 Y 屬病毒 (*Potyvirus*) 成員的 RanMMV，而此病毒目前在台灣並未有發生紀錄，為邊境檢疫攔截到的病毒。本研究利用所攔截之罹病材料，進行 RanMMV 核酸檢測用引子對之設計，以及針對此病毒鞘蛋白進行多元抗體之製備與應用，成功建立 RanMMV 的檢測技術，用於強化對此病毒的邊境監測。

國際間的陸蓮花栽培產區普遍發生有 RanMMV，台灣目前尚未有此花卉的商業產區，僅由業者零星由國外進口切花或少量種球栽種。惟透過花卉材料之進口，有容易將國外已發生的病毒引入國內的風險，極需建立可靠的檢測技術，用於強化病毒的邊境監測。採用病毒核酸檢測及序列比對做鑑定，可獲得較穩定而正確的病毒檢測結果 (Ward *et al*. 1992; Adams 2005; Gibbs & Ohshima 2010)，尤其針

表 4. 利用細菌表現之陸蓮花微嵌紋病毒 ranunculus mild mosaic virus (RanMMV) 鞘蛋白所製備的多元抗體於間接式酵素連結免疫吸附法檢測邊境攔截之陸蓮花罹病組織之效果。

Table 4. Detection of the border-intercepted ranunculus samples with polyclonal antibodies produced with bacterial expressed fusion coat protein of ranunculus mild mosaic virus (RanMMV) in indirect enzyme-linked immunosorbent assay.

Sample[z]	ELISA reading (A_{405nm})[y]	
	Anti-potyvirus[x]	Anti-RanMMVCP
108-1	2.770	2.698
108-2	3.114	2.784
108-3	2.697	2.499
108-4	1.953	2.056
108-5	2.643	2.698
108-6	2.475	2.333
108-7	2.860	2.709
108-8	0.775	1.255
108-9	3.176	2.865
108-10	1.648	2.075
108-11	3.335	3.013
108-12	2.970	2.804
108-13	0.949	1.405
108-14	0.703	1.548
108-15	2.488	2.402
108-16	1.720	1.958
108-17	2.537	2.438
108-18	0.589	0.860
108-19	2.670	2.594
108-20	3.006	2.795
108-21	2.612	2.546
109-1	3.003	2.022
109-2	1.957	2.654
109-3	3.312	1.163
109-4	1.374	2.517
109-5	3.134	2.113
109-6	1.605	1.982
D-CK	3.595	3.210
2H-CK	0.060	0.101

[z] Tested samples are collected from imported cut flowers (108-1–108-21) and bulbs (109-1–109-6) of ranunculus in 2019 and 2020.

[y] The absorbance values were an average of two replicate wells. Samples with Samples with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) readings lower than twofold healthy control (2H-CK) were considered undetectable. Positive control (D-CK) is the bacterial expressed coat protein of RanMMV.

[x] The monoclonal antibody of potyvirus (Agdia Inc., Elkhart, IN, USA) was tested for comparison.

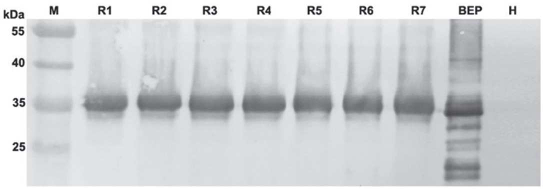

圖 6. 利用細菌表現之陸蓮花微嵌紋病毒 (ranunculus mild mosaic virus; RanMMV) 抗血清於西方墨點法檢測陸蓮花罹病組織。行 M：蛋白質分子量標幟；行 R1–R7：罹染 RanMMV 之陸蓮花組織；行 BEP：細菌表現之 RanMMV 鞘蛋白；行 H：健康陸蓮花組織。

Fig. 6. Western blotting test of antiserum against bacterial expressed coat protein of ranunculus mild mosaic virus (RanMMV) and the virus-infected ranunculus tissues imported from Netherland. Samples were reacted to the 1,000×-diluted antiserum against RanMMV. Lane M: protein marker; lanes R1–R7: virus-infected ranunculus tissues; lane BEP: the lysate of bacteria expressed RanMMV-CP; lane H: healthy tissue of ranunculus.

對邊境檢疫或是新入侵病毒，可快速進行分子鑑定以掌握病毒對象，並能及時處理境外移入的病毒，若再搭配免疫檢測分析，則可處理大量監測樣品的需求。本研究首次針對 2019 年防檢局新竹分局由邊境輸入檢疫取樣的陸蓮花切花材料攔截到境外花卉病毒，初步以市售的 potyvirus 單元抗體及其他國外報導感染陸蓮花的病毒抗體 (包括 CMV、TuMV 和 TSWV)，在葉片出現嵌紋徵狀的陸蓮花切花以 indirect ELISA 法篩檢到 potyvirus，進一步以 potyvirus 簡併式引子對 HRP-5/Oligo-$dT_{(14)}$ 進行 RT-PCR 增幅，由選殖到的病毒 3’ 端約 1.3 kbp 核酸片段定序結果顯示所選殖到的病毒 CP 核苷酸和胺基酸、3’-NCR 核苷酸等序列與已知的 RanMMV 有高於 98.6% 以上的相同度 (表 2、圖 3)，此分子鑑定結果顯示所攔截到的陸蓮花樣品上帶有馬鈴薯 Y 屬成員 RanMMV；後續依據所獲得之 RanMMV-CP 序列進行細菌表現，以融合性蛋白為抗原，所製備成的多元抗體也能與罹病樣品產生正反應，此更證實陸蓮花罹染有 RanMMV，此外，陸蓮花葉片出現的嵌紋徵狀也與國外報導之 RanMMV 引致之病徵相符 (Wang *et al*. 2008; Hayahi *et al*. 2018)。

血清學為鑑定 *Potyvirus* 屬病毒的分類方法之一 (Moghal & Francki 1976)，惟病毒多

元抗體於血清反應中容易有非專一性的結果 (Shepard *et al*. 1974; Shukla *et al*. 1989; Jordan & Hammond 1991; Souiri *et al*. 2014)，也因此提供了廣效性檢測不同病毒的可能性。本研究參照所選殖的 RanMMV-CP 核苷酸序列，構築於表現載體 pET28a(+)，於 *E. coli* 生合成系統誘導產生的融合蛋白顯示帶有 RanMMV 的抗原特性 (圖 5)，以此表現蛋白為抗原製備完成的多元抗體，可應用於 indirect ELISA 和西方墨點法等免疫檢測法檢測 RanMMV (表 3、表 4、圖 6)，除針對同源病毒的檢體外，也與 GoMV、TuMV-YC5、BCMV-BlCM、ZYMV 和 PRSV 等 Potvirus 罹病組織有介於 0.3–0.7 的正反應讀值 (表 3)，顯示 RanMMV-CP 多元抗體對其他 potyvius 亦具有廣效性檢測效力，但仍以對同源的 RanMMV 有較高的檢測讀值 (表 3)。

RanMMV 在陸蓮花切花上的分布，依 indirect ELSIA 法檢測花莖可獲得最高的病毒檢出率及 ELISA 讀值，高於花朵和葉片之檢測結果 (表 1)，此結果顯示 RanMMV 在陸蓮花上的分布不均，因此取花莖樣本進行病毒檢測可獲得較高的準確度。陸蓮花以種球分芽球繁殖，直接採取陸蓮花種球組織進行檢測，也可檢出病毒 (表 4、圖 4)，因此對於進口種球的病毒監測，可先行取樣種球組織以檢測病毒確保種球的健康度，此將可避免病毒隨種球進口而傳入國內，也可預防病毒隨種球無性繁殖而大量散布之風險。

本研究所製備之陸蓮花病毒核酸檢測用引子對及其多元抗體，均能有效地檢測到 RanMMV 病毒，此系統之建立將可強化對陸蓮花進口材料邊境檢疫之自主檢測效能。

引用文獻

Adams, M. J., J. F. Antoniw, and C. M. Fauquet. 2005. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. Arch. Virol. 150:459–479. doi:10.1007/s00705-004-0440-6

Bellardi, M. G., A. Bertaccini, and F. Marini. 1988. A PVY isolate infecting *Ranunculus*. Phytopath. Medit. 27:157–162.

Beruto, M., M. Rabaglio, S. Viglione, M. C. Van Labeke, and E. Dhooghe. 2018. *Ranunculus*. p.649–671. *in*: Ornamental Crops. Vol. 11. (Van Huylenbroeck, J. ed.) Springer. Cham, Switzerland. 887 pp.

Chang, C. A., E. Hiebert, and D. E. Purcifull. 1988. Purification, characterization, and immunological analysis of nuclear inclusions induced by bean yellow mosaic and clover yellow vein potyvirus. Phytopathology 78:1266–1275. doi:10.1094/Phyto-78-1266

Chen, C. C., H. T. Hsu, Y. H. Cheng, C. H. Huang, J. Y. Liao, H. T. Tsai, and C. A. Chang. 2006. Molecular and serological characterization of a distinct potyvirus causing latent infection in calla lilies. Bot. Stud. 47:369–378.

Chen, C. C., C. A. Chang, and F. L. Chiang. 2016. Serological and molecular identification of *Nerine latent virus* infecting blood lily (*Haemanthus multiflorus* Martyn). J. Taiwan. Agric. Res. 65:194–206. doi:10.6156/JTAR/2016.06502.09 (in Chinese with English abstract)

Chen, C. C., F. L. Chiang, and C. H. Huang. 2018. Molecular and serological identification of *Gloriosa stripe mosaic virus* on Christmas bells (*Sandersonia aurantiaca* Hook). J. Taiwan Agric. Res. 67:229–246. doi:10.6156/JTAR.201809_67(3).0001 (in Chinese with English abstract)

Ciuffo, M., M. Testa, R. Lenzi, and M. Turina. 2011. *Ranunculus latent virus*: A strain of *Artichoke latent virus* or a new macluravirus infecting artichoke? Archi. Virol. 156:1053–1057. doi:10.1007/s00705-011-0949-4

Clark, M. F. and A. N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34:475–485. doi:10.1099/0022-1317-34-3-475

Elliott, M. S., F. W. Zettler, M. Gallegati, and N. J. Ko. 1988. A potyvirus infecting *Ranunculus asiaticus*. Acta Hort. 234:39–43. doi:10.17660/ActaHortic.1988.234.3

Emadzade, K., B. Gehrke, H. Peter Linder, and E. Hörandl. 2011. The biogeographical history of the cosmopolitan genus *Ranunculus* L. (Ranunculaceae) in the temperate to meridional zones. Mol. Phylogenet. Evol. 58:4–21. doi:10.1016/j.ympev.2010.11.002

Frenkel, M. J., C. W. Ward, and D. D. Shukla. 1989. The use of 3’non-coding nucleotide sequences in the taxonomy of potyviruses: Application to watermelon mosaic virus 2 and soybean mosaic virus-N. J. Gen. Virol. 70:2775–2783. doi:10.1099/0022-1317-70-10-2775

Gibbs, A. and K. Ohshima. 2010. Potyviruses and the digital revolution. Annu. Rev. Phytopathol. 48:205–

223. doi:10.1146/annurev-phyto-073009-114404

Hayahi, S., Y. Matsushita, Y. Kanno, Y. Kushima, S. Teramoto, and M. Takeshita. 2018. Field survey of ranunculus mild mosaic virus, tomato spotted wilt virus and cucumber mosaic virus infections in *Ranunculus asiaticus* L. in Japan by newly developed multiplex RT-PCR. Eur. J. Plant Pathol. 150:205–212. doi:10.1007/s10658-017-1268-8

Jordan, R. and J. Hammond. 1991. Comparison and differentiation of potyvirus isolates and identification of strain-, virus-, subgroup-specific and potyvirus group-common epitopes using monoclonal antibodies. J. Gen. Virol. 72:25–36. doi:10.1099/0022-1317-72-1-25

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680–685. doi:10.1038/227680a0

Laird, E. F. and R. C. Dickson. 1967. Ranunculus mottle virus; field incidence and insect vector relationships at Ponto, California. J. Econ. Entomol. 60:10–13. doi:10.1093/jee/60.1.10

Li, R. H., F. W. Zettler, D. E. Purcifull, and E. Hiebert. 1998. The nucleotide sequence of the 3’-terminal region of dasheen mosaic virus (Caladium isolate) and expression of its coat protein in *Escherichia coli* for antiserum production. Arch. Virol. 143:2461–2469. doi:10.1007/s007050050476

Lisa, V., A. M. Vaira, R. G. Milne, E. Luisoni, and S. Rapetti. 1990. Tomato spotted wilt virus in cinque specie coltivate in Liguria. Inf. Fitopatol. 40:34–41.

Minutolo, M., R. Sorrentino, V. Masenga, and D. Alioto. 2016. First report of *Broad bean wilt virus 2* and *Ranunculus mild mosaic virus* in *Ranunculus asiaticus* in Southern Italy. Plant Dis. 100:235. doi:10.1094/PDIS-05-15-0563-PDN

Moghal, S. M. and R. I. B. Francki. 1976. Towards a system for the identification and classification of potyviruses. I. Serology and amino acid composition of six distinct viruses. Virology 73:350–362. doi:10.1016/0042-6822(76)90396-2

Ohshima, K., Y. Yamaguchi, R. Hirota, T. Hamamoto, K. Tomimura, Z. Tan, T. Sano, F. Azuhata, J. A. Walsh, J. Fletcher, J. Chen, A. Gera, and A. Gibbs. 2002. Molecular evolution of *Turnip mosaic virus*: Evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. J. Gen. Virol. 83:1511–1521. doi:10.1099/0022-1317-83-6-1511

Pappu, S. S., H. R. Pappu, C. A. Chang, A. K. Culbreath, and J. W. Todd. 1998. Differentiation of biologically distinct peanut stripe potyvirus strains by a nucleotide polymorphism-based assay. Plant Dis. 82:1121–1125. doi:10.1094/PDIS.1998.82.10.1121

Restuccia, P., G. Mancini, A. Bertaccini, and M. G. Bellardi. 2011. Recent findings of viruses infecting *Ranunculus* hybrids in Liguria (Italy). Acta Horti. 901:113–117. doi:10.17660/ActaHortic.2011.901.14

Shepard, J. F., G. A. Secor, and D. E. Purcifull. 1974. Immunochemical cross-reactivity between the dissociated capsid proteins of PVY group plant viruses. Virology 58:464–475. doi:10.1016/0042-6822(74)90081-6

Shukla, D. D., J. Jilka, M. Tosic, and R. E. Ford. 1989. A novel approach to the serology of potyviruses involving affinity purified polyclonal antibodies directed towards virus-specific N termini of coat proteins. J. Gen. Virol. 70:13–23. doi:10.1099/0022-1317-70-1-13

Souiri, A., M. Zemzami, S. Amzazi, and M. M. Ennaji. 2014. Polyclonal and monoclonal antibody-based methods for detection of plant viruses. Eur. J. Sci. Res. 123:281–295.

Turina, M., M. Ciuffo, R. Lenzi, L. Rostagno, L. Mela, E. Derin, and S. Palmano. 2006. Characterization of four viral species belonging to the family *Potyviridae* isolated from *Ranunculus asiaticus*. Phytopathology 96:560–566. doi:10.1094/PHYTO-96-0560

Ushiyama, T., K. Hanada, Y. Honda, N. Aono, and M. Kameyama. 1989. Some viruses isolated from summer phlox, ranunculus and petunia plants. Bull. Kanagawa Horti. Exp. Sta. 38:43–49. (in Japanese with English abstract).

Vaira, A. M., R. G. Milne, G. P. Accotto, E. Luisoni, V. Masenga, and V. Lisa. 1997. Partial characterization of a new virus from ranunculus with a divided RNA genome and circular supercoiled thread-like particles. Archi. Virol. 142:2131–2146. doi:10.1007/s007050050231

Vaira, A. M., M. Vecchiati, V. Lisa, and R. G. Milne. 2000. First report of anemone plants infected by *Ranunculus white mottle virus*. Plant Dis. 84:1046. doi:10.1094/PDIS.2000.84.9.1046B

van Oosten, H. J. 1970. Herbaceous host plants for the sharka (plum pox) virus. Neth. J. Plant Pathol. 76:253–260.

Van Regenmortel, M. H. V., C. M. Farcquet, D. H. C. Bishop, E. B. Cartens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner. 2000. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Academic Press. San Diego, CA. 1162 pp.

Wang, J. H., S. Zhao, and X. M. Yang. 2008. First report of *Ranunculus mild mosaic virus* on *Ranunculus asiaticus* in Yunnan Province, China. Plant Dis. 92:1585. doi:10.1094/PDIS-92-11-1585A

Ward, C. W., N. M. McKern, M. J. Frenkel, and D. D. Shukla. 1992. Sequence data as the major criterion for potyvirus classification. Arch. Virol. Suppl.

5:283–297. doi:10.1007/978-3-7091-6920-9_29

Whitfield, A. E., L. R. Campbell, J. L. Sherwood, and D. E. Ullman. 2003. Tissue blot immunoassay for detection of *Tomato spotted wilt virus* in *Ranunculus asiaticus* and other ornamentals. Plant Dis. 87:618–622. doi:10.1094/PDIS.2003.87.6.618

Identification of Ranunculus Mild Mosaic Virus on *Ranunculus asiaticus* Collected from Border Intercepted Ranunculus and the Development and Application of the Virus Detection Reagents

Chin-Chih Chen[1,*], Jia-Yi Liao[2], Ming-Ling Liao[3], Yu-Chi Liu[3], and Fen-Lang Chiang[2]

Abstract

Chen, C. C., J. Y. Liao, M. L. Liao, Y. C. Liu, and F. L. Chiang. 2022. Identification of ranunculus mild mosaic virus on *Ranunculus asiaticus* collected from border intercepted ranunculus and the development and application of the virus detection reagents. J. Taiwan Agric. Res. 71(1):73–86.

Ranunculus asiaticus cut flowers with mosaic symptoms imported from The Netherlands were intercepted by quarantine at the border customs. The potential causal agents were identified and the detection tools were developed in this study. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA) was performed with various antibodies against different ornamental viruses preserved in the laboratory. All the tested samples were positively reacted with the commercial potyvirus monoclonal antibody (produced by Agdia Inc., Elkhart, IN, USA) and could be positively detected with the potyvirus-degenerated primers (HRP-5/Oligo-dT$_{(14)}$ to amplify a 1.3-kbp amplicon in reverse transcription-polymerase chain reactions (RT-PCRs). Sequencing data showed the nucleic acid sequences of the amplified amplicons were similar to that of ranunculus mild mosaic virus (RanMMV). Both of the nucleotide and deduced amino acid sequences of the cloned cDNA shared more than 98.6% identities with that of RanMMV coat protein gene (GenBank Accession No. LC387972) indicating the intercepted virus is a RanMMV isolate. The further designed RanMMV primer pair (RanMM-u/RanMM-d) can effectively detect the RanMMV on imported mosaic cut flowers and bulb tissues of *R. asiaticus*, and generate a predicted 1.04 kbp amplicon. The cDNA of the RanMMV coat protein open reading frame (CP ORF), containing 825 nucleotides, was constructed in the expression vector of pET28a(+) by artificial gene synthesis, and then the fusion protein (approximately Mt. 30.5 kDa) was expressed in the *Escherichia coli* BL21 host. The resulting RanMMV coat protein was used as an antigen to prepare a polyclonal antibody against RanMMV. The produced polyclonal antibody against RanMMV can successfully detect RanMMV on the imported *R. asiaticus* in immunoassays. RanMMV has not been found in Taiwan and this is the first interception case of the virus at the border. The detection reagents of RanMMV have been successfully developed in this study which might be helpful in improving the efficiency of border quarantine and inspection on imported *Ranunculus* materials.

Key words: *Ranunculus asiaticus*, Potyvirus, Polyclonal antibody, RT-PCR detection.

Received: August 25, 2021; Accepted: Novmber 30, 2021.
* Corresponding author, e-mail: chinzue@tari.gov.tw
1 Associated Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
2 Project Assistants, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
3 Technical Specialists, Hsinchu Branch, Bureau of Animal and Plant Healthy Inspection and Quarantine, Taoyuan, Taiwan, ROC.

Editorial Board

Editor-in-Chief

Hsieh, Ting-Fang
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Editors

Ann, Pao-Jen
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Chang, Ruey-Jang
Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute

Chang, Yung-Ho
Department of Food and Nutrition, Providence University

Chen, Chien-Chung
Division of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Chiling
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Iou-Zen
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University

Chen, Suming
Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University

Chung, Wen-Hsin
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Do, Yi-Yin
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University

Hou, Feng-Nan
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Huang, Biing-Wen
Department of Applied Economics, National Chung Hsing University

Huang, Chao-Chia
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Huang, Jenn-Wen
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Huang, Yuh-Ming
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University

Juang, Kai-Wei
Department of Agronomy, National Chiayi University

Ku, Hsin-Mei
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Kuo, Bau-Jeng
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Lin, Huey-Ling
Department of Horticulture, National Chung Hsing University

Lin, Yann-Rong
Department of Agronomy, National Taiwan University

Liu, Li-Yu
Department of Agronomy, National Taiwan University

Lu, Hsiu-Ying
Miaoli District Agricultural Research and Extension Station

Lu, Kuang-Hui
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Tsay, Jyh-Rong
Taiwan Agricultural Research Institute

Tzou, Yu-Min
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University

Wang, Chan-Sen
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Yang, Chwen-Ming
Department of Post Modern Agriculture, MingDao Unviersity

Yang, Jeng-Tze
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Yen, Gow-Chin
Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University

English Editorial Board

Chang, Chung-Jan
Department of Plant Pathology, University of Georgia, USA

Chung, Kuang-Ren
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Wang, Yin-Tung
Department of Horticultural Sciences, Texas A&M University, USA

Yang, Chin-Cheng Scotty
Department of Entomology, Virginia Polytechnic Institute and State University, USA

Invited Editors

Chen, Yu-Kun
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Editorial Assistants

Wang, Li-Jung
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research

Wang, Zi-Yu
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research

Consultants to Editorial Office

Chen, Lit-Fu
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol. 71 No. 1 March 31, 2022

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

Publisher	Hsueh-Shih Lin
Editor-in-Chief	Ting-Fang Hsieh
Address	No.189, Zhongzheng Rd., Wufeng Dist., Taichung City 413008, Taiwan, ROC
Website	http://www.tari.gov.tw/jtar; E-mail: jtar@tari.gov.tw; Tel: +886-4-2331-7236
Submission	https://www.ipress.tw/J0042
Press	Ainosco Press
Address	18F, No.80, Sec.1, Chenggong Rd., Yonghe Dist., New Taipei City 234634, Taiwan, ROC
Tel	+886-2-2926-6006
E-mail	press@airiti.com
Price	NT$ 175 (per copy)
Distributor	1. GB Books / 1F., No.209, Songjiang Rd., Taipei City 104472, Taiwan, ROC GB Website: http://www.govbooks.com.tw; Tel: +886-2-2518-0207 2. Wunan Books / No.6, Zhongshan Rd., Taichung City 400002, Taiwan, ROC Tel: +886-4-2226-0330